



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA 
Escola Tècnica
Superior
d'Enginyeria

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN EL LITORAL DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

TESIS DOCTORAL:

LAURA SEGOVIA MARTÍNEZ

OCTUBRE 2014

A mi madre,

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida durante este periodo y que de muchas maneras, me han ayudado a estar hoy escribiendo esta tesis.

En primer lugar quiero agradecer esta tesis a mis directores, Pilar y Alberto, sin los cuales no habría sido posible. Por transmitirme sus conocimientos y experiencia, y por ayudarme a darle forma a este proyecto.

A los miembros del grupo Calagua, donde me he sentido como parte de una pequeña familia.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y compañerismo ante los problemas. A Laura, Ana, Sara, Juan, Javier C., Javier E., Brenda, Rafa, Eme, Ángel, Freddy y todos los demás, que aunque no he nombrado también están presentes en mi agradecimiento, por las comidas, cenas y buenos momentos que hemos compartido, que han ayudado a que este camino sea más fácil de seguir. A todos ellos, por su apoyo y amistad, dentro y fuera del trabajo.

A Jose por su confianza en mí y en esta tesis.

A mis hermanos, Martín, Alberto y Alejandro, y a toda mi familia por su apoyo incondicional. En especial a mi padre por el esfuerzo que ha hecho para que yo llegara hasta aquí, y que jamás sabré como agradecer.

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	7
1.1.1 Exposición humana a los disruptores endocrinos.....	9
1.1.2 Exposición animal a los disruptores endocrinos	11
1.2 NORMATIVA.....	12
1.2.1 Europea	12
1.2.2 Estatal y autonómico.....	13
1.2.3 Directiva Marco del Agua (DMA).....	14
1.3 SUSTANCIAS PRIORITARIAS Y OTROS CONTAMINANTES	16
1.3.1 Compuestos organohalogenados.....	17
1.3.2 Compuestos de estaño.....	29
1.3.3 Fenol y alquilfenoles.....	31
1.3.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos	34
1.3.5 Compuestos orgánicos volátiles.....	36
1.3.6 Ftalatos	37
1.3.7 Herbicidas tipo triazinas y trifluralina	37
1.3.8 Herbicidas tipo urea	39
1.3.9 Pesticidas organofosforados	40
1.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS	42
1.4.1 Técnicas de Extracción	42
1.4.2 Técnicas de Separación	49

1.5 BIBLIOGRAFÍA	53
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	59
CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	63
3.1 REACTIVOS.....	65
3.2 MATERIALES.....	66
3.3 INSTRUMENTACIÓN.....	66
3.3.1 Equipo de cromatografía gaseosa	66
3.3.2 Equipo de cromatografía líquida capilar	67
3.4 OTROS EQUIPOS	68
3.5 DISTRIBUCIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO	69
3.5.1 Puntos de muestreo de zonas de transición	70
3.5.2 Puntos de muestreo de aguas costeras	72
3.5.3 Puntos de muestreo de biota.....	73
3.5.4 Puntos de muestreo de sedimento.....	75
3.5.5 Puntos de muestreo de vertidos de depuradora	75
3.6 CAMPAÑAS DE MUESTREO.....	76
3.7 SUSTANCIAS A ANALIZAR EN LAS DISTINTAS MATRICES	78
CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	81
4.1 ANÁLISIS DE AGUAS.....	83
4.1.1 Determinación de compuestos organohalogenados	83
4.1.2 Determinación de cloroalcanos (C10-13).....	91
4.1.3 Determinación de organoestánicos	95
4.1.4 Determinación de fenoles	104

4.2 ANÁLISIS DE BIOTA	109
4.2.1 Determinación de organohalogenados.....	109
4.2.2 Determinación de cloroalcanos (C10-13).....	115
4.2.3 Determinación de organoestánicos	120
4.3 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS.....	127
4.3.1 Determinación de organohalogenados.....	127
4.3.2 Determinación de cloroalcanos (C10-13).....	132
4.5 OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS.....	137
4.5.1 Determinación de fenoles en muestras de agua	137
4.5.2 Determinación de HAP en muestras de agua	137
4.5.3 Derminación de COV en muestras de agua.....	137
4.5.4 Determinación de ftalatos en muestras de agua.....	137
4.5.5 Determinación de triazinas en muestras de agua.....	138
4.5.6 Determinación de fenilureas en muestras de agua	138
4.5.7 Determinación de organofosforados en muestras de agua.....	138
4.5.8 Determinación de fenoles en muestras de biota.....	138
4.5.9 Determinación de HAP en muestras de biota.....	138
4.5.10 Determinación de ftalatos en muestras de biota	139
4.5.11 Determinación de fenoles en muestras de sedimentos	139
4.5.12 Determinación de HAP en muestras de sedimentos	139
4.5.13 Determinación de ftalatos en muestras de sedimentos.....	139
4.5.14 Determinación de organoestánicos en muestras de sedimentos	140
4.6 BIBLIOGRAFÍA	141

CAPÍTULO 5. SUSTANCIAS PRIORITARIAS EN EL LITORAL DE LA C. VALENCIANA	147
5.1 Muestras de agua	149
5.1.1 Aguas de transición	149
5.1.2 Aguas costeras.....	156
5.2 Muestras de biota.....	174
5.2.1 Control de vigilancia (2006-2007-2008)	174
5.2.2 Control operativo (2010).....	186
5.3 Muestras de sedimento.....	199
5.3.1 Control de vigilancia (2010-2011-2012)	199
5.3.2 Sustancias prioritarias en aguas costeras y sedimentos	208
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES GENERALES	213
6.1 Conclusiones sobre los métodos desarrollados	215
6.1.1 Análisis de muestras acuosas	215
6.1.2 Análisis de muestras de biota	216
6.1.3 Análisis de muestras de sedimento.....	217
6.2 Conclusiones sobre el estudio de la presencia de sustancias prioritarias en el litoral de la Comunidad Valenciana	217
6.2.1 Aguas de transición	217
6.2.2 Aguas costeras.....	218
Anexos.....	221

CAPÍTULO 1.
INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

El agua es uno de los compuestos químicos más importantes para la vida formando aproximadamente un 72% de la superficie terrestre. Una característica peculiar del agua es que podemos encontrarla en nuestro planeta en los tres estados de agregación de la materia: sólido, líquido y gaseoso aunque la mayor cantidad del agua forma parte de mares y océanos, alrededor del 97%, los casquetes polares y glaciares contiene un 2% y un 0.001% se encuentra en la atmósfera. Resulta curioso observar que, siendo imprescindible para la vida humana, tan sólo un 0.7% es agua dulce.

Debido al aumento de la contaminación en los últimos años la calidad de ésta es peor, considerando un agua contaminada cuando su calidad o composición natural se ve afectada. Algunas de las definiciones más distintivas se han tomado para aclarar este concepto:

«La contaminación consiste en una modificación, generalmente, provocada por el hombre, de la calidad del agua, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca y las actividades recreativas, así como para los animales domésticos y la vida natural» (Carta del Agua, Consejo de Europa, 1968)

«Un agua está contaminada cuando se ve alterada su composición o estado, directa o indirectamente, como consecuencia de la actividad humana, de tal modo que quede menos apta para uno o todos los usos a que va destinada, para los que sería apta en su calidad natural» (C.E.E. de las Naciones Unidas, 1961)

De modo que podemos encontrar infinidad de contaminantes: compuestos químicos orgánicos, inorgánicos y organometálicos, agentes físicos, bionutrientes y microorganismos. Todos ellos pueden afectar en mayor o menor medida a la calidad del agua, siendo su toxicidad el factor más importante. Factor que viene en función de la concentración de éste en el medio y del tiempo de exposición.

En la década de 1930 comenzaron a emplearse compuestos orgánicos sintéticos para el control de plagas. Con la aparición de estos compuestos y su uso se plantearon hipótesis sobre los efectos adversos de éstos en la salud humana o animal.

Fue el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), que comenzó a utilizarse en los años 40 como sustituto de otros pesticidas tóxicos y persistentes, el que hizo saltar la alarma social al aparecer los primeros efectos en la salud humana, cuando se detectó que los pilotos de los aviones fumigadores de campos de cultivo presentaban una reducción en la cantidad y calidad del esperma (Mendes A., 2002). Este compuesto fue ampliamente utilizado en la Segunda Guerra

Mundial para combatir enfermedades como tifus o malaria, que se habían cobrado miles de vidas en la Primera Guerra Mundial, rociándose con este pesticida tanto la población civil como las tropas (Colin Baird, 2001). En 1953 se descubrió que el DDT tenía actividad estrogénica. Años después, la bióloga Raquel Carson publicó su obra "Silent Spring" (1963), donde denunciaba los efectos que estos compuestos estaban provocando en la fauna animal. Estas evidencias condujeron a la prohibición de uso y producción de estas sustancias a nivel mundial desde la década de los setenta.

Actualmente, hay en el mercado más de 100.000 sustancias químicas con diversas utilidades, para muchas de ellas se han estudiado los efectos sobre la salud humana y el medioambiente, sin embargo, no hay suficiente información sobre todas. Debido a esto, se ha establecido por parte de las autoridades europeas una lista de sustancias prioritarias que engloba todas aquellas sustancias que suponen un riesgo tanto para el ser humano como para el medio. En esta lista se incluyen los compuestos que poseen alguna de las siguientes características:

- Cancerígeno, mutágeno y tóxico para la reproducción
- Disruptor endocrino (DE)
- Tóxico, persistente y bioacumulativo

Se denominaron disruptores endocrinos a aquellos compuestos químicos que, actuando como agonistas o antagonistas, son capaces de alterar el sistema endocrino de humanos y animales, acuáticos y terrestres. Dicho nombre fue designado por primera vez en una conferencia organizada por la Dra. Theo Colborn, del World Wildlife Fund., en Wisconsin, en el año 1991 (Sonnenschein et al., 2002). Según su naturaleza los DE se clasifican en: estrogénicos o xenoestrogénicos. Las sustancias estrogénicas son aquellas cuya función es claramente hormonal, ya sean hormonas naturales procedentes del ser humano como estrógenos, testosterona, progesterona, 19-noretisterona, 17 β -estradiol, fitoesteroles, sesquiterpenos; u otros compuestos generados a partir de sustancias sintéticas metabolizadas por el organismo humano como estrona, 17 β -trembolona o DDE (diclorodifeniltricloroetileno). Las sustancias xenoestrogénicas son aquellas derivadas de actividades industriales y que además tienen actividad estrogénica.

Son muchos los DE "clásicos" cuyos efectos se conocen y han sido probados en animales desde hace décadas, como son el DDT, el endrín, el metoxicloro y los bifenilos policlorados. Otros en cambio se conocen desde hace pocos años como es el caso de los ftalatos. El censo Europeo (COM (1999) 706) recoge un total de 553 sustancias artificiales y 9 hormonas (sintéticas y naturales) con capacidad para alterar el sistema endocrino, clasificadas en tres categorías:

i. Sustancias de las que se tienen pruebas que confirman su capacidad (efectiva o potencial) para causar alteraciones endocrinas y que no son objeto de restricción o no están contempladas en la legislación comunitaria vigente (9 sustancias)

ii. Sustancias de las que se tiene pruebas que confirman su capacidad (efectiva o potencial) para causar alteraciones endocrinas y que ya son objeto de reglamentación o bien se halla en el ámbito de aplicación de la legislación comunitaria (118 sustancias)

iii. Sustancias insuficientemente documentadas (435 sustancias)

La exposición a estas sustancias es inevitable, ya que no sólo están presentes en productos de uso cotidiano, sino que también llegan a los seres humanos a través de los alimentos. En general, estos compuestos son liposolubles y, por consiguiente, son capaces de bioacumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos. Pueden estar presentes en el agua acumulándose en sedimentos y zooplancton, y a través de estos entrar en la cadena trófica (Sarkar S.K. et al., 2008). Su bioacumulación así como su movilidad dependen de su coeficiente de reparto ($\log K_{ow}$), ya que cuanto mayor es éste más tendencia tiene el compuesto a bioacumularse (Claver et al., 2006). Aquellas sustancias cuyo $\log K_{ow}$ es mayor a 1 son consideradas peligrosas debido a su posible adsorción a través de membranas celulares y bioacumulación en los tejidos adiposos. Se consideran sustancias moderadamente bioacumulables, persistentes y peligrosas las que poseen tiempos de vida media superiores a 8 semanas en agua y $\log K_{ow}$ iguales o superiores a 5 (Reglamento 1107/2009/CE).

El problema que suponen estos compuestos no es sólo su toxicidad y biocumulación, sino también su persistencia en el medio o capacidad de un compuesto para permanecer en el medio manteniendo su actividad biológica y química, expresada como el tiempo de vida medio del compuesto ($T_{1/2}$). Algunas de estas sustancias pueden llegar a permanecer décadas en el medio sin degradarse, otras incluso pueden degradarse generando metabolitos más tóxicos.

1.1.1 EXPOSICIÓN HUMANA A LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Como ya se ha mencionado son muchas las formas en que el ser humano está expuesto a los DE, ya que estos están presentes en muchos productos de uso cotidiano: en detergentes (Sonnenschein et al., 1998), latas de conserva, plásticos, preservativos (Rivas et al., 2004), píldoras anticonceptivas, plaguicidas, insecticidas, espermicidas y herbicidas. Además, debido a su baja biodegradabilidad y a su bioacumulación son fácilmente transportados por agua, aire y a través de la cadena trófica.

Es indiscutible la relación que hay entre estos compuestos y el aumento masivo, en las últimas décadas, de determinadas enfermedades con dependencia hormonal, tanto en hombres como en mujeres.

Algunos estudios citan que mujeres expuestas a compuestos organoclorados como DDT u otros bifenilos policlorados tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama y ovario que una mujer que no ha estado expuesta a éstos (Amaral Mendes, 2002). En general, son muchos los estudios que en mayor o menor medida han conseguido establecer una relación entre estas sustancias y el cáncer de mama.

La endometriosis es otra de las enfermedades que podrían estar ligadas con la exposición a estos DE. Esta enfermedad causa infertilidad en la mujer y en ocasiones puede conllevar a la aparición de tumores. El uso de dietilestilbestrol (DES) para la prevención de abortos entre los años 50 y 70, tuvo como consecuencia el denominado “síndrome del feto frágil”, denominado así por provocar infertilidad y cáncer de vagina en las hijas de las mujeres tratadas con este fármaco (Sonnenschein et al., 2002; Joffe, 2003). Por otro lado, se sabe que la ingesta diaria de etinilestradiol a través de la píldora anticonceptiva incrementa el riesgo de endometriosis (Amaral Mendes, 2002).

El número de casos de cáncer de testículo ha aumentado entre un 2 y un 4% anual en hombres menores de 50 años desde los años sesenta (Waring y Harris., 2005). Asimismo, las muertes por cáncer de próstata han aumentado alrededor de un 17% en los últimos 30 años (Amaral Mendes, 2002). La infertilidad masculina también ha sido objeto de estudio, muchos estudios indican una disminución de la calidad y cantidad de esperma en los últimos años, incluso se incluye la hipótesis sobre estos compuestos como causantes de este problema (Irvine, 2000; Carlsen et al., 1992).

La proporción entre sexos también podría ser modificada por la exposición a estos compuestos (Moller, 1996). Estudios realizados en Seveso (Italia), después del accidente en el que se liberaron más de 30 kilogramos de dioxina (julio de 1976), muestran que este compuesto influye en las hormonas que regulan la formación del cigoto. Los resultados de estos estudios indican que la relación entre niñas y niños nacidos los meses posteriores al accidente fue 65:35%, siendo la relación normal 49:51% (Mocarelli, 2000).

Sin embargo, aunque hay un aumento claro en la aparición de estas enfermedades en los últimos años, hay diversos estudios que exponen que esto no es generalizado, sino que se encuentran diferencias geográficas e incluso raciales (Torappi et al., 1996).

1.1.2 EXPOSICIÓN ANIMAL A LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Diversos trabajos se han enfocado hacia el efecto que producen los DE en animales, resultando especialmente afectada la fauna marina. Los daños provocados por los DE en estos animales son mucho más evidentes que en los mamíferos.

Es importante resaltar a los cetáceos, ya que son animales que debido a su fisiología poseen una gran capa de grasa hipodérmica con capacidad para almacenar compuestos lipofílicos y con tendencia a acumular contaminantes ambientales. Estos animales han sido objeto de estudio pudiendo comprobarse que, efectivamente, su tejido adiposo estaba contaminado con distintos DE, además de metales pesados (Carballo et al., 2004).

En los años 80 se descubrió el efecto denominado "intersex", se trata del intercambio de sexo en peces expuestos a estos compuestos provocado por la presencia de vitelogenina (proteína típica de las hembras para la formación de huevos) en el plasma de machos (Sumpter, 2005, Waring y Harris, 2005). La presencia de DE durante la etapa de diferenciación sexual de peces provocaba el desarrollo de ambos sexos, incluso el intercambio sexual. Además, la exposición durante la etapa de desarrollo sexual provocaba inhibición en el desarrollo de las gónadas, así como la reducción del tamaño de estos órganos (Jobling et al., 1998). Este problema se asocia principalmente a la presencia de alquilfenoles y etoxilatos, ambos procedentes de detergentes y plásticos, detectados a altos niveles en los tejidos adiposos de peces y moluscos (Ferrara et al., 2008). También se han estudiado los efectos androgénicos, es decir, la masculinización de las hembras, de algunas sustancias en peces, como es el caso de la 17β -trembolona generado en el metabolismo de hormonas de crecimiento de ganado utilizadas en algunos países (Sumpter, 2005).

Los estudios en mamíferos han resultado muy útiles en la identificación de diversas enfermedades en humanos. Ratas expuestas a dietilestilbestrol (DES) sufrían la proliferación de células epiteliales en las glándulas mamarias (Brown y Lamartinière, 1995). Además, se ha observado que la exposición a pentaclorobenceno y otros pesticidas organoclorados provocan hipotiroidismo en ratas (Crisp et al., 1998).

Fue en aves donde por primera vez en los años 60 se vieron los efectos que generaban los compuestos clorados utilizados entonces como pesticidas, especialmente DDT, al disminuir su capacidad de reproducción. Estos compuestos también provocan la feminización del macho, e impiden que la reproducción sea viable ya que hacen la cáscara del huevo demasiado frágil para incubarlo adecuadamente o incluso demasiado dura de modo que las crías no pueden romperlos (Halldin et al, 2003).

Los efectos producidos por los DE en animales invertebrados también resultan evidentes, alrededor de 1970 se detectaron hembras de gasterópodos con órganos reproductores masculinos.

1.2 NORMATIVA

1.2.1 EUROPEA

En los últimos años la contaminación de las aguas ha aumentado considerablemente, haciendo más difícil la obtención de agua potable y comprometiendo otros usos. Diferentes estudios realizados han mostrado la presencia de sustancias prioritarias tanto en aguas superficiales como subterráneas. Como consecuencia algunos organismos como la Agencia Estadounidense de Protección Ambiental (EPA) o la Unión Europea (EU) han legislado en las últimas décadas distintas normativas, entre ellas la Directiva Marco del Agua (DMA, 2000/60/CE). Asimismo, existen distintas normativas para la regulación de determinados contaminantes en función de su toxicidad, bioacumulación y persistencia en el medio. A continuación se describen algunas de las normativas más importantes sobre aguas.

En el ámbito europeo, la primera normativa se estableció en el año 1976 y fue la Directiva 76/160/CEE del Consejo, de 8 de diciembre 1975 relativa a la calidad de las aguas de baño, que fue modificada por la Directiva 91/692/CEE del Consejo, de 23 de diciembre de 1991.

En el año 1976 se legisló la Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la comunidad.

En el año 1980 se legisló la Directiva 80/778/CCE del Consejo, de 15 julio de 1980, relativa a la calidad de las aguas de consumo humano, que fue modificada por la Directiva 98/83/CEE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998.

En el año 1991 se legisló la Directiva 91/271/CE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, que fue modificada por la Directiva 98/15/CE de la Comisión, de 27 de febrero de 1998, posteriormente por el Reglamento (CE) nº 1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, y finalmente por el Reglamento (CE) nº 1137/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de octubre de 2008.

Posteriormente, se legisló la Directiva 2000/60/CE de 23 de octubre de 2000, del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecía un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (Directiva Marco del Agua), modificada por la Directiva 2008/105/CE de 16 de diciembre de 2008, del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a las

normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas (DNCA). Recientemente, la DNCA ha sido modificada por la Directiva 2013/39/UE de agosto de 2013.

Por otro lado, existe una amplia legislación específica sobre determinadas sustancias contaminantes. En el ámbito internacional encontramos el Convenio de Estocolmo que fue firmado por 120 países el 23 de mayo de 2001, por el que se establece básicamente la eliminación de los contaminantes orgánicos persistentes (COP).

El Consejo de la Unión Europea aprobó el 11 de marzo de 1999 la Directiva 1999/13/CE relativa a la limitación de emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV).

En cuanto a la comercialización de fitosanitarios y biocidas, el 21 de octubre de 2009 fue aprobado el Reglamento 1107/2009/CE relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo, y Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Por otro lado, está vigente la Directiva 98/8/CE, de 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas.

Además, en 2001 se publicó el Libro Blanco de la Comisión sobre la Estrategia para la Futura Política en materia de Sustancias y Preparados Peligrosos presentado por la Comisión el 27 de febrero de 2001, donde se recogían todas las propuestas de la Comisión relativas a una estrategia cuyo objetivo fundamental es el desarrollo sostenible.

El 1 de junio de 2007 entró en vigor la regulación 1907/2006/CE (REACH), cuyo objetivo es regular el registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y los preparados químicos, con el fin de garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y del medio ambiente, así como la libre circulación de sustancias en el mercado interior.

1.2.2 ESTATAL Y AUTONÓMICO

En el ámbito estatal la Ley 29/1985, de 2 de agosto de 1985, fue la primera ley de aguas. El objeto de esta ley es la regulación del Dominio Público Hidráulico, del uso del agua y del ejercicio de las competencias atribuidas al Estado en las materias relacionadas con dicho dominio en el marco de las competencias delimitadas en el artículo 149 de la Constitución. En 1986 se legisló el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprobó el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrollaba los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, y que fue modificado por el Real Decreto 606/2003. Éste se modificó por la Ley 46/1999, de 13 de diciembre. Posteriormente, se aprobó el Real Decreto 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijaban objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes.

En cuanto a aguas de baño se promulgó el Real Decreto 734/1988, de 1 de julio, por el que se establecían normas de calidad de las aguas de baño. El 22 de julio de ese mismo año se estableció la Ley 22/1988, de Costas.

En lo referente a aguas residuales, en 1998 se legisló el Real Decreto 2116/1998, de 2 de octubre, por el que se modificaba el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecían las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales.

En el año 2001 se estableció el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprobaba el texto refundido de la Ley de Aguas, y que derogaba a la anterior Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.

En 2003 fue legislado el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecían los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

En el ámbito autonómico la primera ley que entró en vigor fue la Ley 7/1986, de 2 de diciembre, sobre utilización de aguas para riego. Posteriormente, se legisló la Ley 2/1992, de 26 de marzo, de saneamiento de las aguas residuales de la Comunidad Valenciana y en el año 2003 se publicó la Orden de 3 de julio de 2003, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se establecía el Programa de Actuación sobre las Zonas Vulnerables designadas en la Comunidad Valenciana. Por último, en 2008 se legisló el DECRETO 201/2008, de 12 de diciembre, del Consell, por el que se regula la intervención ambiental en las instalaciones públicas de saneamiento de aguas residuales.

1.2.3 DIRECTIVA MARCO DEL AGUA (DMA)

La Comunidad Europea ha tomado medidas con el fin de reducir las emisiones de las sustancias prioritarias, y los problemas que éstas puedan ocasionar en el medio ambiente. Para ello, como se ha comentado anteriormente, se estableció en el año 2000 la Directiva Marco del Agua (DMA, 2000/60/CE). Esta directiva tiene en cuenta las siguientes consideraciones:

El agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal. (Punto 1)

La necesidad de desarrollar una política comunitaria integrada de aguas (Punto 9)

La política comunitaria de aguas precisa un marco legislativo coherente, efectivo y transparente, que proporcione principios comunes y un marco general de actuación. (Punto 18)

La Directiva deberá contribuir a la reducción progresiva de la contaminación por vertidos, emisión o pérdida de sustancias peligrosas en el agua. (Punto 22)

La buena calidad del agua contribuirá a garantizar el abastecimiento de agua potable a la población. (Punto 24)

Para prevenir y controlar la contaminación, la política comunitaria de aguas se debe basar en el control de la contaminación en la fuente, fijando valores límite de emisión y normas de calidad medioambiental. (Punto 40)

Uno de los aspectos destacables de la DMA, es que incluye y protege todas las aguas de Europa: de superficie, subterráneas, de transición y costeras.

El objeto principal de esta Directiva es garantizar la reducción progresiva de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias prioritarias, mediante medidas específicas, con el fin de proteger y mejorar los sistemas acuáticos, además de paliar los efectos de las inundaciones y sequías. (*Artículo 1*)

Los objetivos medioambientales que se defienden en la Directiva son, generalmente y para todos los tipos de aguas, la protección, regeneración y mejora de las masas de agua aplicando las medidas necesarias para evitar o limitar la entrada de contaminantes en las aguas. (*Artículo 4*)

Se plantean una serie de estrategias para combatir la contaminación de las aguas contaminadas, como es la presentación de una lista de sustancias prioritarias que presenten un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él, que se generará tras realizar pruebas de ecotoxicidad acuáticas y toxicidad humana. Además, se establece la presentación de propuestas para la reducción o supresión gradual de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de las sustancias prioritarias, mediante un seguimiento de la contaminación (*Artículo 16*). De acuerdo con este artículo se establecen 33 sustancias prioritarias, que son todas aquellas que representan un riesgo importante tanto para el medio acuático, como a través de éste.

De acuerdo con los objetivos de la DMA, se conseguirá un buen estado de las aguas cuando se obtengan, para las 33 sustancias prioritarias y otros contaminantes fijados, concentraciones en agua, sedimentos y/o biota por debajo de las normas de calidad ambiental (NCA). Dichas normas se establecen, únicamente para aguas superficiales, en la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, que entró en vigor en enero de 2009 modificando a la Directiva 2000/60/CE.

El desarrollo experimental de este trabajo de tesis se ha llevado a cabo entre 2008 y el primer trimestre de 2013, por lo que se ha basado en la Directiva 2008/105/CE (DNCA). Esta

directiva establece normas de calidad ambiental, en su Anexo I, de conformidad con las disposiciones y objetivos de la Directiva 2000/60/CE para las 33 sustancias prioritarias y otros 8 contaminantes. Estas NCA se han establecido basándose en los efectos agudos y crónicos que la contaminación química puede producir en el medio acuático y la salud humana, y están establecidas para proporcionar protección contra la exposición a largo plazo y corto plazo. En el ANEXO I de este trabajo se muestran las NCA estipuladas por la Directiva 2008/105/CE. Esta Directiva establece NCA para concentraciones medias anuales (NCA-MA) y NCA para concentraciones máximas admisibles (NCA-CMA).

La Directiva 2008/105/CE recomienda el estudio de determinadas sustancias en muestras de sedimento y bivalvos debido a que son propensas a la acumulación en estas matrices. En concreto: antraceno, BDE, cadmio y sus compuestos, cloroalcanos, dietilhexilftalato, fluoranteno, hexaclorobenceno, hexaclorobutadieno, hexaclorociclohexano, plomo y sus compuestos, mercurio y sus compuestos, pentaclorobenceno, hidrocarburos poliaromáticos y estaño y sus compuestos. Esta Directiva recomienda la aplicación de NCA para biota o sedimento, fijando estas NCA en 20 µg/kg para mercurio y sus compuestos, 10 µg/kg para hexaclorobenceno o 55 µg/kg para hexaclorobutadieno.

Asimismo, esta Directiva proponía una serie de sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias. (Anexo III de la Directiva 2008/105/CE). El plazo de transposición para la Directiva 2008/105/CE en España era 13 julio 2010, siendo finalmente traspuesta el 21 de enero de 2011 mediante el Real Decreto 60/2011.

La Directiva 2013/39/UE, de agosto de 2013, modifica a las directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE. Esta directiva amplía a 48 el número de sustancias prioritarias, incluyendo en su lista: dicofol, quinoxifeno, ácido perfluorooctanosulfónico, diclorovós, ciburtrina, cipermetrina, terbutrina, aclonifeno, hexabromodoclododecano, heptacloro y dioxinas. Además, plantea normas de calidad ambiental en biota para algunas sustancias prioritarias existentes como BDE (0.085µg/Kg), fluoranteno (30µg/Kg), HAP (5µg/Kg), hexaclorobenceno (10µg/Kg), hexaclorobutadieno (55µg/Kg) y algunas nuevas como dicofol (33µg/Kg), ácido perfluorooctanosulfónico (9.1µg/Kg), hexabromodoclododecano (167µg/Kg), heptacloro (0.0067µg/Kg) o dioxinas (0.0065µg/Kg).

1.3 SUSTANCIAS PRIORITARIAS Y OTROS CONTAMINANTES

Para el desarrollo de este trabajo se han considerado las sustancias prioritarias y otros contaminantes establecidos por la DMA 2008/105/CE, debido a los bajos niveles de concentración exigidos por la normativa, y la escasez de métodos sensibles para la determinación de éstas, excepto algunos metales y sus derivados. Además, en este trabajo se

han incluido sustancias que, aun no siendo consideradas en la Directiva 2008/105/CE, poseen propiedades similares a algunas de estas sustancias prioritarias o pertenecen a la misma familia. Las sustancias estudiadas se han clasificado, según su estructura, características y usos, en diferentes familias: compuestos organohalogenados, organoestánicos, cloroalcanos de cadena corta (C10-13), derivados fenólicos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, ftalatos, herbicidas tipo triazina, herbicidas tipo urea y pesticidas organofosforados. A continuación se describe cada una de estas sustancias, así como su origen y su efecto en el medio. En la Tabla 1 se pueden ver algunas propiedades físicas de estos compuestos.

1.3.1 COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS

1.3.1.1 Alacloro

El N-metoximetil-2',6'-dietil-2-cloroacetanilida, comúnmente conocido como alacloro (Figura 1) es un sólido inodoro a temperatura ambiente, cuya solubilidad en agua es despreciable, es soluble en disolventes orgánicos como benceno, etanol, éter o acetona.

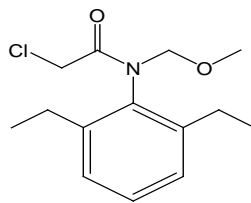


Figura 1. Estructura del alacloro

Fue introducido por primera vez en 1957 por la casa comercial Monsanto como herbicida para el tratamiento de diferentes cultivos como maíz, soja o algodón entre otros, evitando el crecimiento de determinadas hierbas. Este herbicida pertenece a la familia de cloroacetanilidas, cuyo modo de acción es la inhibición de las elongasas y de los pirofosfatos del geranilgeranil (GGPP), ambas enzimas son precursoras de la giberelina, hormona encargada del crecimiento de algunas plantas.

Está clasificado por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) en el grupo B2 como posible carcinógeno humano, además de ser un carcinógeno animal. Diferentes estudios realizados sobre su toxicidad en ratas muestran que el DL₅₀ (dosis letal, 50%) oral está entre 930 y 1350 mg/kg, mientras que el DL₅₀ dermal es 13300 mg/kg y el CL₅₀ (concentración letal, 50%) tras 4 horas de inhalación es mayor de 5.1 mg/L. Está clasificada por la UE como disruptor endocrino (DE) de categoría 1, sustancia con evidencia o potencial evidente de disrupción endocrina (Com(1999)706). No es un compuesto bioacumulable, con un factor de bioacumulación (FBC) de 50 en organismos acuáticos (CE, 2007).

En cuanto a la persistencia en el medio, diferentes estudios prueban que no se degrada fácilmente en el agua, el DT_{50} (período requerido para una disipación por transformación del 50% del compuesto de origen) está entre 200 y 500 días en agua de río, pero si éste se agrega a sedimento puede ser menor. El DT_{50} en suelo en condiciones aerobias es generalmente menor a 30 días, la mayoría de estudios establecen ente 4 y 24 días por lo que no es muy persistente en este medio, además tiene una movilidad alta. En aire el tiempo de vida medio no es muy elevado alrededor de 40 días.

En la Unión Europea se han prohibido todos sus usos desde diciembre de 2006 por la Decisión 2006/966/CE relativa a la no inclusión del alacloro en el Anexo I de la Directiva 91/414/CE. Con la Decisión 2006/966/CE se establecía la retirada del mercado a partir del 18 de junio de 2007 de cualquier producto fitosanitario que contuviera alacloro.

1.3.1.2 Endosulfán

Técnicamente el endosulfán o 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxido (Figura 2) se puede encontrar como mezcla de isómeros α y β (7:3). Puro es un sólido cristalino, pero la mezcla comercial de isómeros tiene color pardo, es poco soluble en agua ($0.33\text{mg}/\text{dm}^3$) pero soluble en disolventes orgánicos.

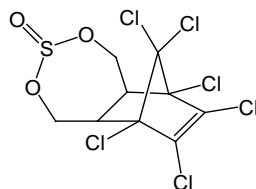


Figura 2. Estructura del endosulfán

Se obtiene mediante una reacción de adición Diels-Alder a partir de hexaclorociclopentadieno y cis-buteno-1,4-diol en xileno. El aducto que resulta de esta adición se hace reaccionar con tionil cloruro para dar lugar a la mezcla isomérica de endosulfán.

El endosulfán fue introducido en el mercado en 1954 por Farbwerke Hoechst AG, actualmente conocida como Bayer CropScience, para su uso como fitosanitario. Ha sido empleado en todo el mundo como pesticida para el control de plagas, tanto en cosechas de comestibles como de no comestibles, y también se ha empleado como protector de maderas.

No se ha probado que sea un carcinógeno, aunque se ha demostrado que es altamente tóxico para el sistema neurológico. Actúa como antagonista no competitivo de los receptores GABA (ácido γ -aminobutírico) que son el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral. Estos receptores son canales iónicos que regulan entrada de Cl^- a través de un gradiente

electroquímico, generando la hiperpolarización de la membrana celular y la inhibición del bombardeo de neuronas. El endosulfán impide la entrada de Cl^- e indirectamente bloquea la función de los receptores GABA provocando la hiperestimulación y la excitación incontrolada del cerebro (Silva et al. 2010).

Diferentes estudios realizados sobre su toxicidad muestran que el DL_{50} dermal en conejos es 3750 mg/kg, el DL_{50} oral en ratas es de 481 mg/kg, y el CL_{50} tras 4 horas de inhalación para ratas es mayor de 0.34 mg/l. Está clasificada por la UE como DE de categoría 1, sustancia con evidencia o potencial evidente de disrupción endocrina (Com(1999)706). Tiene un factor de bioacumulación (FBC) entre 1690 a 7280 en organismos acuáticos y su constante $\log K_{ow}$ está entre 3.55-3.62 por lo que no es un compuesto altamente bioacumulable (CE, 2007).

En cuanto a la persistencia en el medio, el endosulfán tiene un tiempo de vida medio o DT_{50} en suelo neutro de 35 a 150 días. En agua es degradado entre 4 y 5 semanas. En la V Conferencia de las partes del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes, celebrada en abril de 2011, se proponía incluir al endosulfán en el Anexo A de dicho convenio.

El endosulfán está prohibido en la Unión Europea desde junio de 2006 por la Decisión 2005/864/EC relativa a la no inclusión del endosulfán en el anexo I de la Directiva 91/414/CE salvo para determinados países, entre ellos España, en los que se permitía el uso como fitosanitario hasta junio de 2007.

1.3.1.3 Aldrín, dieldrín, isodrín y endrín

El aldrín o *(1R,4S,5S,8R)-1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4 α ,5,8,8 α -hexahidro-1,4,5,8-dimetanonaftaleno* es un ciclodieno que se forma a partir de ciclopentadieno y norbornadieno por una reacción de Diels-Alder. Fue llamado así en honor al químico alemán Kurt Alder, creador de la reacción que da lugar a este compuesto. El *(1R,4S,5S,8R)-1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4 α ,5,6,7,8,8 α -octahidro-1,4,5,8-dimetanonaftaleno*, conocido como dieldrín se obtiene como producto principal de la degradación del aldrín. El *(1R,4S,5R,8S)-1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4 α ,5,6,7,8,8 α -octahidro-1,4,5,8-dimetanonaftaleno* o endrín es un estereoisómero del dieldrín. Finalmente, el isodrín o *(1R,4S,5R,8S)-1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4 α ,5,8,8 α -hexahidro-1,4:5,8-dimetanonaftaleno* se obtiene de la deshidroclorinación del endrín y, a su vez, es estereoisómero del aldrín (Figura 3).

Estos compuestos fueron desarrollados en la década de los 50 para sus usos como insecticidas y sustitutos del DDT ya que eran efectivos en un mayor número de insectos. Aldrín y endrín eran empleados como insecticidas para suelos; en cambio, el dieldrín era empleado para salud pública y uso doméstico.

Todos ellos son compuestos tóxicos, siendo el isodrin el que menor toxicidad presenta, en peces un CL_{50} de 12 $\mu\text{g/L}$ frente a 0.5-3.9 $\mu\text{g/L}$ del aldrín o 1.3-180 $\mu\text{g/L}$ del dieldrin. Los valores de DL_{50} oral en ratas van desde 7.0 mg/kg para isodrin hasta 39-60 mg/kg para aldrín. Los valores de DL_{50} dermal van desde 23 mg/kg para isodrin hasta 98 mg/kg para aldrín.

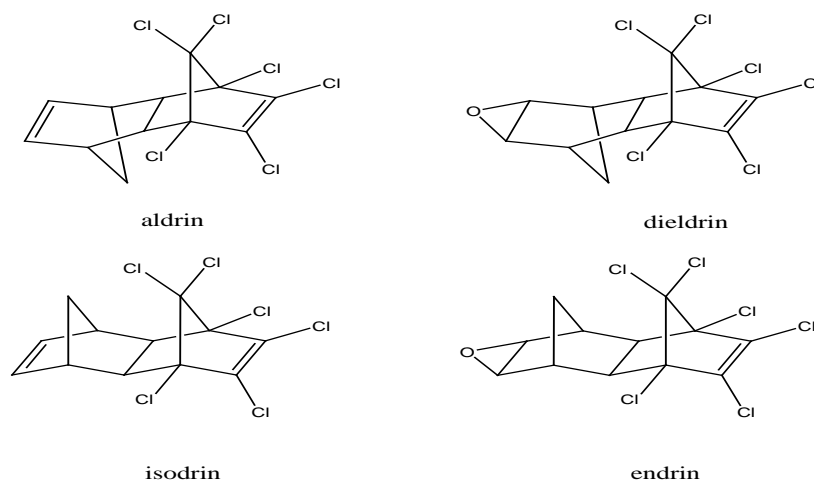


Figura 3. Estructura de aldrín, dieldrin, isodrin y endrin

Diferentes estudios muestran que el dieldrin afecta al sistema nervioso de forma similar a otros tóxicos dopaminérgicos o Parkinsonianos, degenerando la sustancia negra que es la principal fuente de producción de Dopamina en el cerebro, también actúa como inhibidor del receptor GABA. Se detectaron elevadas concentraciones de dieldrin, tanto en sérum como en la sustancia negra, de pacientes que habían sufrido Parkinson y (J.R. Richardson et al. 2006). Por otro lado, su carcinogenicidad se ha estudiado extensamente desde que, en 1987, la EPA los clasificara como posibles carcinógenos humanos. Estudios en ratas y ratones muestran que aldrín y dieldrin actúan como promotor no-genotóxicos en la formación de tumores en hígado de ratón, pero no en ratas (D.E. Stevenson et al. 1999). Debido a esta controversia, IARC clasifica al aldrín y al dieldrin en el grupo B2 como posible carcinógeno humano, y el endrin en el grupo 3 como sustancia con pruebas suficientes de carcinogenicidad en animales pero no aplicables a seres humanos. Aldrin, dieldrin y endrin están clasificados por la UE como DE, sustancia con evidencia o potencial evidente de DE (Com(1999)706).

El aldrín tiene una vida media entre 20 y 100 días, es un compuesto poco persistente ya que rápidamente es metabolizado a dieldrin, en cambio éste último tiene un DT_{50} en suelo de más de 7 años. El endrin es ligeramente soluble y se puede encontrar en el agua superficial, se estima que su vida media en agua es de 4 años (EPA, 1979), su tiempo de vida medio en suelos es aproximadamente de 14 años degradándose a su aldehído y cetona. Tienen una elevada

tendencia a la bioacumulación con valores de FBC desde 6400 para el endrín hasta 21000 para el isodrín.

Aldrín, dieldrín y endrín están prohibidos en la UE desde diciembre de 1978 por la Directiva 79/117/CEE relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas.

1.3.1.4 DDT

El 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano comúnmente conocido como DDT (Figura 4), fue sintetizado por primera vez en el año 1874 por Othmar Zeilder a partir de clorobenceno y cloral (tricloroacetaldehido), reacción catalizada por ácido sulfúrico. Sin embargo, sus propiedades como pesticida no fueron descubiertas hasta 1939 por el químico suizo Paul Herman Müller, quien fue galardonado con el Premio Nobel de medicina y psicología en 1948 por el que consideraban el "insecticida ideal", ya que no parecía tóxico para el ser humano. El DDT de grado técnico contiene aproximadamente un 77% de p,p-DDT, 15% de o,p-DDT y otros derivados como DDD (diclorodifenildicloroetano) o DDE (diclorodifenildicloroetileno).

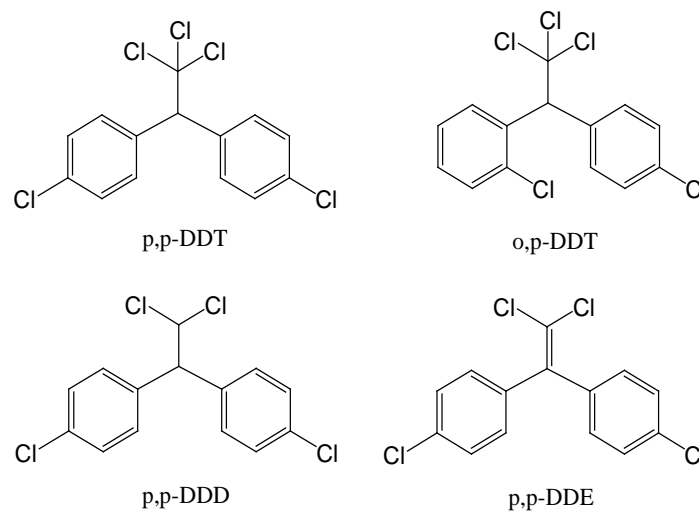


Figura 4. Estructura del p,p-DDT, o,p-DDT, p,p-DDD y p,p-DDE

Estudios realizados en ratas demuestran la toxicidad de esta familia de compuestos, ya que actúan como inhibidores de la aromatasas, enzima encargada de la síntesis de estrógenos. Esta enzima es fundamental durante el embarazo, un déficit de ésta puede provocar abortos, partos prematuros o malformaciones en el feto (Wojrowicz et al., 2003). Asimismo, genera problemas hormonales en el desarrollo como hipotiroidismo, cretinismo, desarrollo psicomotor retardado, y se ha relacionado con cáncer de pulmón, hígado y tiroides entre otros (J. Beard,

2006). Sin embargo, no se ha probado que sea un carcinógeno humano, por ello está clasificado por la IARC como un posible carcinógeno humano en el grupo 2B.

El DDT es muy persistente en el medioambiente, presenta tiempo de vida medio en suelos de 2-15 años. Además posee un elevado poder de bioacumulación con $\log K_{ow}$ de 6.72 y FBC desde 1000-10⁶. Después de tres décadas desde su prohibición aún sigue siendo detectado en aguas, sedimento y organismos vivos. Su toxicidad en el medio acuático ha sido estudiada obteniendo valores de CL_{50} en peces entre 0.4 y 0.89 $\mu\text{g/L}$, en el caso de bivalvos los valores observados eran mayores a 10 mg/L .

Fue prohibido en 1978 por la Directiva 79/117/CEE relativa a la prohibición de salida al mercado de determinadas sustancias activas, por la que se permitía el DDT como fitosanitario para determinados usos.

1.3.1.5 Hexaclorociclohexano

El hexaclorociclohexano o HCH (Figura 5) fue sintetizado por primera vez en 1825 por Michael Faraday, pero hasta 1942 no se descubrió su acción como pesticida. Comercialmente se ha utilizado el HCH de grado técnico, que es sintetizado a partir de benceno y cloruro en presencia de luz ultravioleta, de esta reacción se obtienen diferentes isómeros α (60-70%), β (5-12%), γ (10-12), δ (6-10%), ϵ (3-4%) y otros (1-2%) (Li et al. 2002), aunque el único que realmente posee actividad insecticida es el isómero γ . En 1960 se comenzó a sustituir por lindano que contenía más de 90% del isómero γ (Pavlíková et al. 2012) y podía ser purificado con múltiples extracciones con metanol.

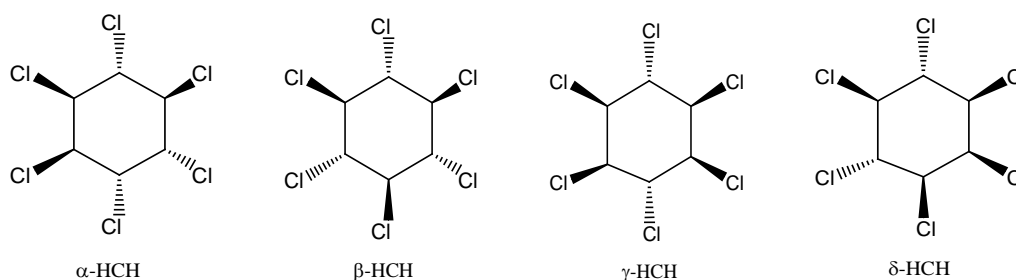


Figura 5. Estructura de los isómeros de HCH

El isómero β es el más resistente a la biodegradación, posiblemente debido a la posición ecuatorial de todos los átomos de cloro, y el más bioacumulable con un valor de FBC 1460, frente a 1100 para el isómero α y 850 para el isómero γ . El lindano tiene un período de semidesintegración de 2.3 a 13 días en el aire, de 30 a 300 días en el agua y de 50 días en sedimentos; el isómero α tiene un DT_{50} de 175 días en suelos.

Diferentes estudios muestran que de los cuatro isómeros el más tóxico es el isómero β , los valores de CL_{50} observados en la bibliografía mantienen el siguiente orden $\delta > \gamma > \alpha > \beta$ (A. Srivastava, et al. 2010). Algunos autores han aportado datos sobre la relación existente entre enfermedades neurológicas como Alzheimer o Parkinson y el β -HCH (Anderson P. 2009, J.R. Richardson et al. 2011). Por otro lado, pruebas farmacológicas en mamíferos también han mostrado la actividad neurodepresora de los isómeros γ y α , ambos, especialmente el γ , al igual que endosulfán actúan como antagonistas no competitivos de los receptores GABA. Los estudios de carcinogenicidad de estos isómeros son muy limitados pero todos ellos están clasificados por IARC en el grupo B2. El lindano está clasificado por la Unión Europea como sustancia con evidencia de ser DE (Com(1999)706).

El lindano fue prohibido como fitosanitario por la Directiva 2000/801/CE relativa a la no inclusión de éste en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contuvieran esta sustancia activa. Con la entrada en vigor del Convenio de Rotterdam en diciembre de 2005 el HCH fue prohibido en todos sus usos, salvo como intermediario en la fabricación de insecticidas en el caso de HCH técnico, y como insecticida tóxico en veterinaria y salud pública, el lindano estaría permitido hasta diciembre de 2007.

1.3.1.6 Hexaclorobutadieno

Hexaclorobutadieno o HCBd (Figura 6), es un líquido incoloro a temperatura ambiente, poco soluble en agua. Se obtiene como subproducto en la síntesis de tetracloruro de carbono y tetracloroetileno. Sus principales usos son como disolvente o lubricante y, en algunos países también como fumigante en viñedos.

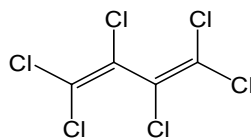


Figura 6. Estructura del hexaclorobutadieno

El HCBd es un compuesto tóxico, su CL_{50} en mamíferos es de 0.370 mg/L. Estudios realizados en ratas muestran que tiene un DL_{50} oral de 82 mg/kg y DL_{50} dermal de 175 mg/kg. Además, ya que posee un valor de $\log K_{ow}$ de 4.75, se considera un compuesto altamente bioacumulable, se estima que su FBC en peces está entre 2000 y 19000.

No se ha demostrado que el HCBd sea carcinógeno, por ello está clasificado por la IARC dentro del grupo 3. Diferentes estudios en ratas han demostrado que indirectamente actúa como una nefrotoxina, éste entra en la ruta metabólica del glutatión y es metabolizado por la

glutación-s-transferasa generando el glutatión conjugado, que a su vez es metabolizado a la cisteína conjugada que al ser metabolizada por la enzima β -liasa renal genera metabolitos tóxicos para el riñón (T. Green et al., 2003).

En el medioambiente es relativamente estable, se degrada rápidamente en suelos en condiciones aeróbicas, en aguas posee un tiempo de vida medio de 30 días pero se puede adherir al sedimento y a la materia suspendida. Actualmente está recomendada su inclusión en el Convenio de Estocolmo como compuesto orgánico persistente (COM(2010)151).

1.3.1.7 Hexaclorobenceno

Hexaclorobenceno o HCB (Figura 7), es un sólido cristalino de color blanco con olor característico. Se obtiene como subproducto en la producción de pentaclorobenceno y en la cloración de otros hidrocarburos, el HCB de grado técnico contiene impurezas de pentaclorobenceno (PeCB) y 1,2,4,5-tetraclorobenceno. Comenzó a usarse como insecticida en los años 40 para el control de plagas del suelo e insectos y como fungicida para tratar los cultivos.

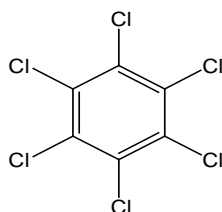


Figura 7. Estructura del hexaclorobenceno

Es un compuesto tóxico, los valores de DL_{50} oral en ratas es de 10000 mg/kg y dermal 1700-4000 mg/kg. Los valores de CL_{50} para HCB son 3.6, 1.6, 4 mg/L para rata, gato y ratón, respectivamente, aunque, es muy bioacumulable (FBC de 35000 y $\log K_{ow}$ 6.2). Como consecuencia del dramático suceso ocurrido en Turquía entre 1955 y 1959, se pudo comprobar que la ingesta de este contaminante producía porfiria cutánea tardía en los seres humanos, además de diferentes afecciones en hígado y riñones. El HCB se introduce en las rutas metabólicas y es desechado como PeCB-cisteína conjugado.

No se ha demostrado que sea un carcinógeno humano, por ello la IARC lo clasifica en el grupo B2. Debido a las evidencias que muestran que tiene capacidad para alterar el sistema endocrino fue clasificado como DE en 2001 (COM(2001)262).

Su biodegradación en suelos es lenta, se estima un tiempo de vida medio de 2.7 a 5.7 años, en aire entre 156 días y 4.2 años. En agua tiene una baja solubilidad (0.0047 mg/L) y el tiempo de vida medio es mayor a un año.

El HCB está prohibido como fitosanitario desde diciembre de 1978 por la Directiva 79/117/CEE relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas. Posteriormente, por su capacidad de bioacumulación, su elevada volatilidad y su persistencia en el medio fue incluido en la lista de COP por el Convenio de Estocolmo (2006).

1.3.1.8 Pentaclorobenceno

El pentaclorobenceno o PeCB (Figura 8) se utilizó durante muchos años como fungicida, como retardante de llama y en fluidos dieléctricos, especialmente tras la prohibición de los policloro bifenilos (PCBs). Su principal uso es como intermediario en la fabricación de quintoceno o pentacloronitrobenzoceno, pero este producto está prohibido desde el año 2000.

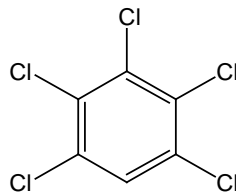


Figura 8. Estructura del pentaclorobenceno

Diferentes estudios en ratas han demostrado que provoca daños irreversibles en hígado y riñón similares a los provocados por el HCB (Denbesten et al. 1993). Igualmente, el PeCB está catalogado como disruptor endocrino (COM(2001)262).

Es un compuesto persistente en el medio, su vida media en agua superficial es de 194-1250 días. La biodegradación en aguas no superficiales es más lenta, 776-1380 días (CEPA, 1993). En suelos se estima que el DT_{50} es de 275 días y en aire el tiempo de vida medio es 277 días, aunque es un compuesto muy fácilmente transportable, además, es muy bioacumulable en organismos acuáticos, su FBC es 3400-13000 y su $\log K_{ow}$ es 4.8-5.17. En 2009 fue incluido como COP (COM(2009)27).

1.3.1.9 Pentaclorofenol

Pentaclorofenol o PCP (Figura 9) fue sintetizado por primera vez en los años 30 a partir de la reacción de cloración del fenol en presencia de un catalizador como cloruro de aluminio o cloruro férrico, a 191°C. Ha sido empleado como fungicida, herbicida, alguicida, desinfectante y como aditivo en las pinturas para preservar la madera. El PCP técnico suele tener una pureza entre 84-90% y contiene impurezas como fenoles policlorados, dibenzo-p-dioxinas cloradas y dibenzofuranos policlorados.

El pentaclorofenol impuro es gris oscuro a pardo y existe como polvo, granos o escamas. El pentaclorofenol puro existe como cristales incoloros. Es un compuesto altamente persistente en agua, en suelo tiene un DT_{50} de alrededor de 63 días y es bioacumulable (FBC=3000).

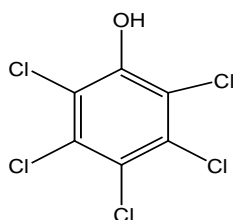


Figura 9. Estructuras del pentaclorofenol

La toxicidad del PCP técnico es mucho mayor que la del PCP puro. Su CL_{50} en ratas es de 14 mg/L, los valores datados de DL_{50} en ratas es 25-230 y 105 mg/kg oral y dermal, respectivamente. Se ha demostrado que es causante de porfiria cutánea como ocurría con HCB o PeCB, también hay diferentes estudios que muestran su relación con la generación de tumores en hígado de rata aunque no se ha podido establecer una relación clara con cáncer en humanos (IARC, 1986). Está clasificado por la IARC en el grupo B2 como posible carcinógeno humano.

El uso y producción de PCP fue prohibido en Alemania en 1994, posteriormente en Dinamarca en 1996. En 2002 se incluía en la lista de sustancias activas excluidas como fitosanitarios y se prohibía su uso en la Comunidad Europea como tal a partir julio de 2003 (2076/2002/CE). Además, debido a su persistencia en el medio se propuso como compuesto orgánico persistente para ser considerado por el Convenio de Estocolmo (COM(2010)151).

1.3.1.10 Triclorobenceno

De triclorobenceno o TCB se pueden encontrar tres isómeros (Figura 10): 1,2,3-triclorobenceno (TCBI), 1,2,4-triclorobenceno (TCBII) y 1,3,5-triclorobenceno (TCBIII). Se puede obtener por cloración de benceno o diclorobenceno, o a partir de la deshidrohalogenación del hexaclorociclohexano en presencia de una base fuerte.

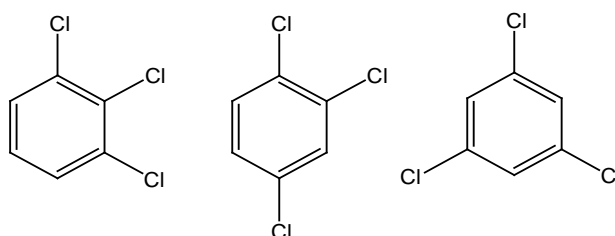


Figura 10. Estructuras de isómeros del triclorobenceno

Se han utilizado como lubricantes, agentes desengrasantes, como herbicidas acuáticos e intermediarios en la fabricación de otros herbicidas y como disolventes para fullerenos y poliácenos. Además, se emplea en equipos eléctricos actuando como fluido dieléctrico y medio de transferencia de calor.

Los estudios realizados a diferentes clorobenzenos vislumbran que el isómero TCBII junto con el PeCB son lo más tóxicos para hígado, riñón y hormona tiroidea (DerBesten et al. 1991).

Se estima que su tiempo de vida medio es de unos días en agua y tiene un alto potencial de biodegradación. No obstante, estos compuestos tienen un ligero potencial de bioacumulación en los organismos acuáticos, poseen valores de $\log K_{ow}$ sobre 4.

Los usos de estos compuestos están prohibidos por la Directiva 2005/59/CE en concentraciones superiores a 0.1% salvo como intermediario de síntesis, como solvente en conducciones cerradas o en la producción de 1,3,5-trinitro-2,4,6-triaminobenceno (TATB).

1.3.1.11 Polibromo-difenil-éteres

Dentro de este grupo de compuestos hay hasta 209 congéneres con diferente grado de halogenación, de fórmula general $C_{12}H_{(10-x)}Br_xO$ (Figura 11). El pentabromo-difenil-éter de grado técnico contiene 50-60% de pentabromo-difenil-éter, 24-38% de tetrabromo-difenil-éter, 4-8% de hexabromo-difenil-éter y trazas (0-1%) de tribromo-difenil-éter.

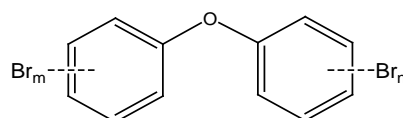


Figura 11. Estructura general de los difenil-éteres polibromados

Han sido extensamente utilizados como agentes ignífugos en tapices, maderas, cables, conectores y otros componentes electrónicos. Su combustión genera dibenzo-p-dioxinas y dibenzofuranos polibromados altamente tóxicos.

Estos compuestos y sus conjugados hidroxilados poseen una estructura similar a las hormonas tiroideas, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), de forma que pueden competir por el receptor de la hormona tiroidea (Blanco et al, 2011). Estudios realizados en ratas reflejan que además de afectar a la glándula tiroidea, puede causar daños neuronales, en hígado y en riñón (ATSDR, 2004). Los polibromo-difenil-éteres (PBDE) están catalogados como DE (COM(1999)706).

Los PBDEs no son elevadamente tóxicos, estudios en ratas indican un DL_{50} de 2-5 g/Kg, pero tienen una elevada tendencia a la bioacumulación (FBC 5000-35000) y son muy persistentes en el medio acuático (COM(2000)347). La IARC los ha clasificado en el grupo 3 ya que no hay evidencias claras que muestren que son carcinógenos.

La producción de PBDEs de bajo grado de bromación, está prohibida en la Unión Europea desde 2003 por la Directiva 2003/11/CE que limita la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo, éter de octabromodifenilo). Algunos de estos congéneres han sido clasificados como COP e incluidos en el Convenio de Estocolmo sin exenciones de uso (COM(2009)127).

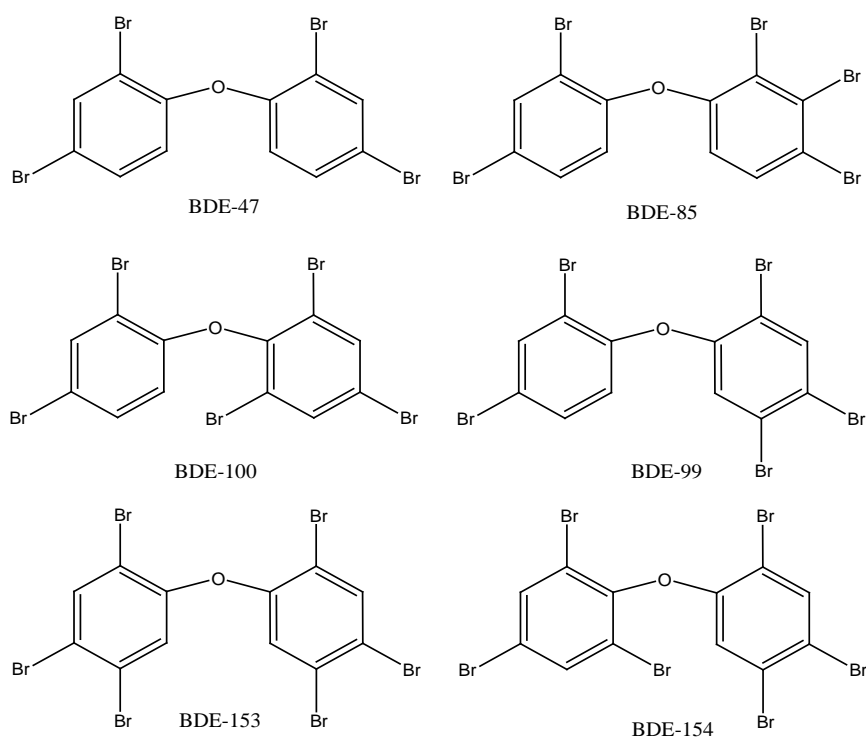


Figura 12. Congéneres de pentabromo-difenil-éter técnico

1.3.1.12 Cloroalcanos de cadena corta (C10-13)

Las cloroalcanos (CP) son mezclas complejas de n-alcános policlorados con diferente grados de cloración, entre 30 y 70%. Estas mezclas contienen un elevado número de isómeros de fórmula general $C_xH_{(2x-y+2)-y}Cl_y$ ($x=10-13$, $y=1-13$). En función de la longitud de la cadena se pueden clasificar en tres grupos: CP de cadena corta o SCCP (short chain chlorinated paraffins), formados por cadenas de 10 a 13 átomos de carbono; CP de cadena media o MCCP (medium chain chlorinated paraffins), que incluye cadenas de 15 a 17 átomos de carbono; y CP de cadena

larga o LCCP (long chain chlorinated paraffins), que incluyen cloroalcanos desde 18 a 30 átomos de carbono.

Se obtienen por cloración directa de n-alquenos derivados del petróleo y acción de luz UV. Debido a su estabilidad térmica y química son utilizados como lubricantes, selladores, retardantes de llama y como plastificantes desde los años 30, tras la prohibición de los PCBs, lo que aumentó su uso y producción.

Las propiedades físicas de estos compuestos varían en función del grado de cloración, de la longitud de la cadena y de la posición de los átomos de cloro. Son fluidos viscosos de color amarillo, la densidad de estos fluidos varía entre 1.2 y 1.6 g/cm³, prácticamente insolubles en agua (0.15-0.47 mg/L). Poseen baja volatilidad por su presión de vapor (2.1×10^{-9} -0.004 mmHg) y tienden a la acumulación, poseen valores de la constante de reparto que van desde 5.06 hasta 8.12 (WHO).

Son especialmente tóxicos y bioacumulables en organismos acuáticos. Se han observado factores de bioacumulación de 140000 para mejillón y 21500-114000 para trucha. Las parafinas con un grado de cloración superior al 60% están clasificadas por la IARC como probable carcinógeno humano (grupo 2B). No hay evidencia clara de su carcinogenicidad, pero diferentes estudios han mostrado, en ratas, que la ingesta de estas sustancias aumenta la concentración de tiroxina (T4) en sangre (S. Hallgren et al. 2002).

Son compuestos altamente persistentes, habiéndose detectado en sedimentos que datan de 1947 (Convención de Estocolmo, 2007). Su tiempo de vida medio en aire es de 0.85 a 7.2 días. En agua no cabe esperar hidrólisis, pero el estudio realizado por Koh y Thieman (2001) expone que estos compuestos pueden sufrir degradación fotolítica por acción de luz UV.

En diciembre de 2009, las SCCP se incluyeron como COP. Sus usos están restringidos por el Reglamento 552/2009 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) en lo que respecta a su anexo XVII. Por la que está prohibida la comercialización de productos que contengan concentraciones superiores al 1% en peso, cuando los productos estén destinados a la elaboración de metales o el engrasado del cuero.

1.3.2 COMPUESTOS DE ESTAÑO

Dentro de los compuestos organoestánicos hay una serie de sustancias con sustituciones arílicas y alquílicas en el átomo de estaño. Han sido utilizados desde los años 50 principalmente como fungicidas en pinturas de barcos, en torres de refrigeración y como estabilizadores de polí-cloruro de vinilo (PVC) especialmente tributilo de estaño (TBT) y dibutilo de estaño (DBT). El

trifenilo de estaño (TPhT) también ha sido utilizado en la agricultura como fungicida y como avicida (WHO, 1999). En cambio, los derivados monosustituídos (monobutilo de estaño, MBT, o monofenilo de estaño, TPhT) tienen muy limitados sus usos, prácticamente como estabilizadores de PVC.

Entre las propiedades físicas de estos compuestos (Tabla 1) cabe destacar la elevada tendencia a la bioacumulación que poseen los compuestos trisustituídos con respecto a los compuestos de menor grado de sustitución. Además, estas sustancias son persistentes en el medio. El tiempo de vida medio de TBT en agua es de 11 meses, en sedimento puede variar entre 2 y 5 meses.

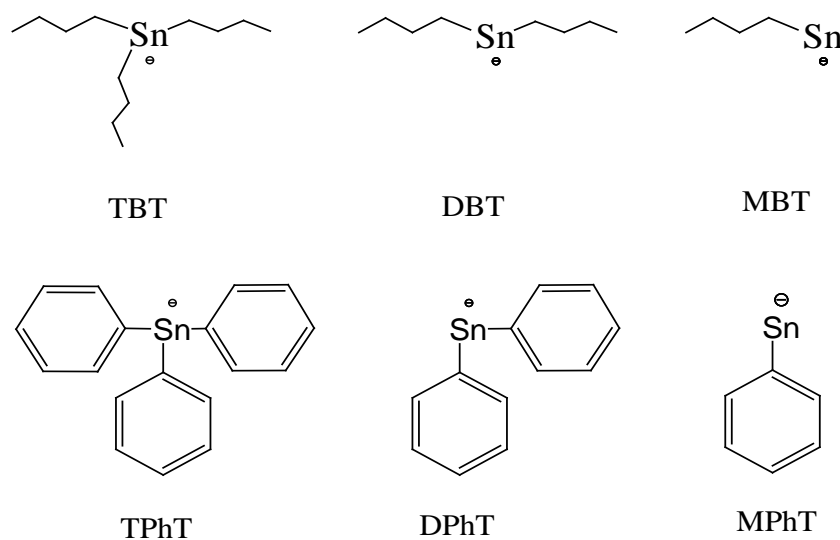


Figura 13. Compuestos de estaño

La elevada toxicidad del tributilo de estaño (TBT) en organismos acuáticos es conocida debido al denominado efecto imposex observado en gasterópodos, que consiste en una superimpresión de rasgos masculinos en hembras y que en algunas especies de gasterópodos produce esterilidad (Bryan et al., 1993). Además debido a su lipofilia ($\log K_{ow}$) tiende a concentrarse en estos organismos (Barriero et al., 2004). Su toxicidad aumenta con el número de sustituciones en el átomo de estaño, el TBT posee un DL_{50} oral en ratón de 55 mg/kg hasta un DL_{50} de 2140 mg/Kg para el MBT.

De entre estos compuestos la Directiva 2009/425/CE prohíbe el uso de TBT y TPhT en concentraciones superiores a 0.1% en peso de estaño a partir de julio de 2010. En cuanto a DBT, no se utilizarán artículos que contengan 0.1% en peso de estaño a partir de enero de 2012.

1.3.3 FENOL Y ALQUILFENOLES

1.3.3.1 Fenol

El fenol (Figura 14) fue descubierto por Friedlieb Ferdinand en 1834 al ser extraído del alquitrán, desde entonces ha sido ampliamente utilizado para la síntesis de otros compuestos fenólicos, en la producción de resinas fenólicas y, durante muchos años, como antiséptico debido a sus propiedades desinfectantes.

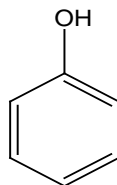


Figura 14. Estructura del fenol

Es elevadamente tóxico, produce daños en hígado, riñones y sistema nervioso central (IARC, 1989). Su DL_{50} oral en ratón es 270 mg/Kg y dermal en 630 mg/Kg. No se ha demostrado que sea un carcinógeno humano pero si hay diferentes estudios que lo relacionan con algunos tipos de tumores. Por ello fue incluido en la primera lista de sustancias prioritarias (Regulación 1179/94/CE).

Debido a la solubilidad del fenol en agua, la mayor parte de las emisiones de este contaminante terminan disueltas en ésta, su tiempo de vida media en este medio es entre 2 y 20 días. Es tóxico para el medio acuático, con un valor de CL_{50} de 125 mg/L, pero tiene poca tendencia a la bioacumulación ($\log K_{ow}$ de 1.46).

1.3.3.2 O-Cresol

El o-cresol o 2-cresol (Figura 15), es un derivado alquílico del fenol. Es sólido a temperatura ambiente, tiene un punto de fusión de 31°C y de ebullición de 191°C. Es muy utilizado como disolvente, como intermediario en la fabricación de pesticidas y como desinfectante.

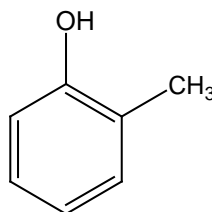


Figura 15. Estructura del o-cresol

Este compuesto no está clasificado como carcinógeno por la IARC, aunque hay diferentes estudios que demuestran que puede provocar daños en hígado, riñón, pulmones y cerebro, su toxicidad ha sido estudiada en rata, obteniendo valores de DL_{50} oral igual a 940 y dermal entre 890 y 1380 mg/Kg y, además, está considerado como disruptor endocrino.

Debido a su solubilidad en agua (2.6 g/L) cabe esperar su presencia en el medio acuático donde se considera tóxico para los organismos vivos (CL_{50} 6.2-8.4 mg/L), además tiene una elevada persistencia en agua, su tiempo de vida medio es mayor a un año. Sin embargo, no es un compuesto bioacumulable, se estima su FBC de 10.7 y posee un $\log K_{ow}$ de 2.2. En sedimento es rápidamente biodegradado.

1.3.3.3 2-Clorofenol

El 2-clorofenol (Figura 16) es un líquido ámbar con olor desagradable. Es soluble en agua (28.5 g/L) y más denso que ésta (1.24 g/cm³). Es utilizado principalmente como intermediario en la fabricación de pesticidas y tintes, también como desinfectante, bactericida y germicida.

La exposición a 2-clorofenol puede causar daños en hígado y riñones. No se ha demostrado que sea una sustancia carcinógena, pero está considerado por la IARC como un posible carcinógeno humano.

En cuanto a su toxicidad en el medio acuático, no es considerado como una sustancia bioacumulable su $\log K_{ow}$ es de 2.15 y se estima que su FBC está entre 3.8 y 34. Estudios realizados en organismos acuáticos indican valores de CL_{50} de 2.5-29.7 mg/L para crustáceos y 5-7 mg/L para peces.

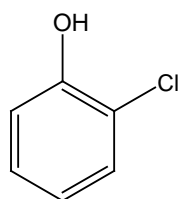


Figura 16. Estructura del 2-clorofenol

1.3.3.4 Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) es sólido a temperatura ambiente, soluble en agua e insoluble en lípidos. Es un monómero utilizado en la manufactura de policarbonato y epoxi-resinas. Fue sintetizado por primera vez por el químico ruso A.P. Dianin en 1891, mediante una reacción de condensación de cetonas con fenoles.

En los años 30 se descubrió su actividad estrogénica y, por ello, está clasificado como DE (COM(2001)262). La IARC no lo clasifica como sustancia carcinogénica pero diferentes estudios en ratas han mostrado la relación entre la presencia de BPA y el desarrollo de leucemia. Los estudios realizados ofrecen valores de DL_{50} entre 4.2 y 12 mg/Kg.

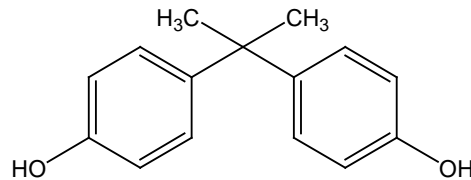


Figura 17. Estructura del BPA

Es rápidamente degradado en agua superficial, se estima un tiempo de vida medio de horas. Su persistencia en el medio no es elevada (DT_{50} de 18-120 días) y no se considera un compuesto bioacumulable. No obstante, estudios realizados en organismos acuáticos de agua dulce y de agua salada indican que es una sustancia tóxica en este medio.

Actualmente no está prohibido su uso, pero está restringido en la fabricación de determinados productos (Reglamento 321/2011, relativo a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes).

1.3.3.5 Alquilfenoles

Para este trabajo se consideraron aquellos compuestos con una alta actividad estrogénica, como el octilfenol y los nonilfenoles: nonilfenol técnico y 4-nonilfenol, que son los descritos por la Directiva Marco del Agua.

El octilfenol (OP) es un derivado fenólico extensamente utilizado en la industria para la producción de resinas, gomas y surfactantes. También, se le ha dado otros usos como fungicida, estabilizante o adhesivo. Al igual que el octilfenol, los nonilfenoles (NP) han sido ampliamente utilizados en la fabricación de plásticos, gomas y como surfactantes (Figura 18). En la Tabla 1 se pueden ver algunas propiedades físicas de estos compuestos.

Su persistencia en el medio es elevada, el octilfenol tiene tendencia a la adsorción sobre materia orgánica o sedimento por lo que la fotodegradación o la fotólisis en agua son insignificantes, así como la biodegradación aeróbica. En cambio, en medios anaerobios si se ha observado biodegradación, pero es demasiado lenta.

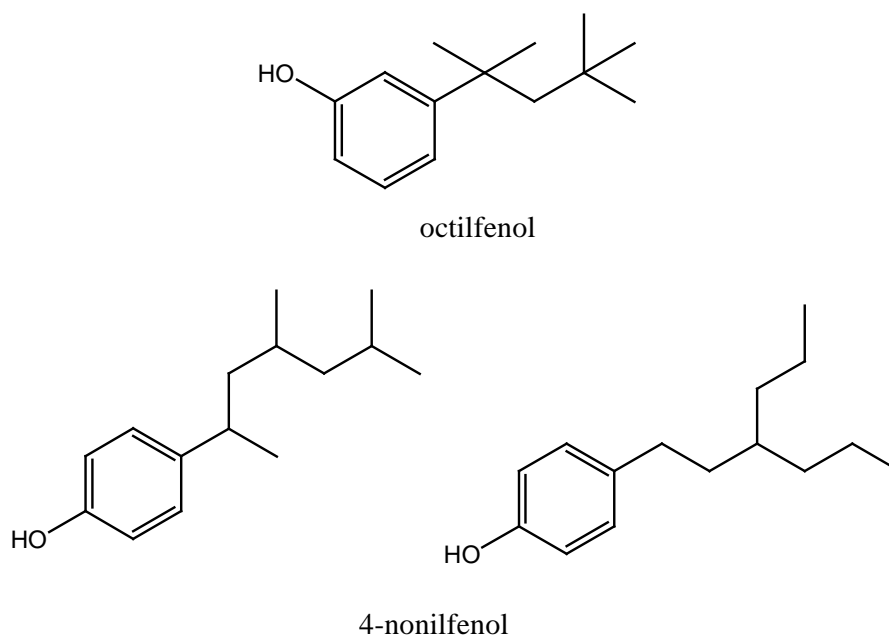


Figura 18. Estructura alquilfenoles

Estos alquilfenoles están clasificados por REACH como sustancias peligrosas (Reglamento 793/93) y, aunque no se consideran carcinógenos, producen serios efectos sobre la salud humana y especialmente contra el sistema endocrino. La presencia de OP en plásticos está regulada por la Directiva 90/128/CE por la que se prohíbe su uso en plásticos que se encuentren en contacto con productos alimenticios.

La comercialización y uso de NP está restringida en Unión Europea por el Reglamento (CE) 552/2009 que exige la reducción de usos de NP y sus etoxilatos a concentraciones menores del 0.1%. Su uso en productos fitosanitarios está prohibido por el Reglamento 2024/2006/CE y el Reglamento 1223/2009/CE su uso en productos cosméticos. Igualmente, las emisiones de estos compuestos están reguladas por el Reglamento 166/2006/CE, en un máximo de 1 kg/año en vertidos al agua y 1 Kg/año en vertidos al suelo.

1.3.4 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los hidrocarburos poli-aromáticos o HAP (Figura 19) forman una amplia familia de derivados del benceno. Todos ellos están formados por dos o más anillos aromáticos, cuya forma más sencilla es el naftaleno con dos anillos. La principal fuente de estos compuestos es la combustión incompleta a elevada temperatura de materia orgánica (origen pirolítico), aunque también se encuentran presentes en el crudo de petróleo, carbón, alquitrán y varios productos de refinería (origen petrogénico). Los HAP de origen petrogénico se caracterizan por tener bajo peso molecular (compuestos de hasta 4 anillos aromáticos) mientras que los HAP de origen

pirolítico corresponden a los de mayor peso molecular (compuestos de 4, 5 y 6 anillos aromáticos).

En cuanto a la toxicidad, se ha demostrado que algunos de estos compuestos son carcinógenos en animales, como el benzo(a)pireno clasificado en el grupo 2 por la IARC. Pero no es tanto el problema de toxicidad de estos compuestos como el de sus metabolitos. Dentro del organismo los HAP son rápidamente oxidados a quinonas y epóxidos secundarios, compuestos muy reactivos con el ADN.

La presencia de algunos de estos compuestos en productos alimenticios ha sido restringida por el Reglamento 835/2001. También su comercialización y uso en determinados productos en concentraciones mayores a 10 mg/Kg como suma de todos ellos, por la Directiva 552/2009/CE. Por otro lado, el reglamento 1223/2009/CE prohíbe su uso en productos cosméticos.

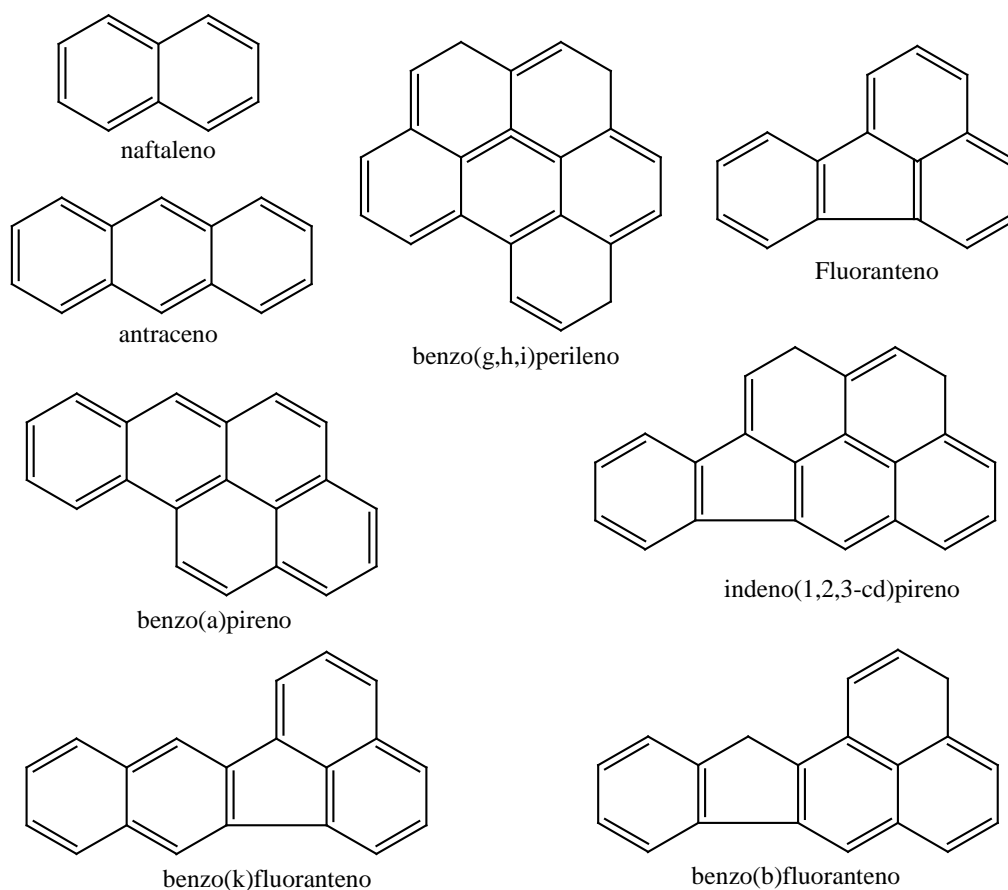


Figura 19. Estructura de algunos HAP

1.3.5 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

Cuando se habla de compuestos orgánicos volátiles, COV, o VOC según sus siglas en inglés, se están englobando una amplia gama de compuestos de diferente naturaleza. Generalmente, son compuestos de bajo peso molecular derivados del benceno que debido a su elevada presión de vapor son muy volátiles. El Real Decreto 117/2003 define COV como “todo compuesto orgánico que tenga a 293.15 K una presión de vapor de 0.01 kPa o más, o que tenga una volatilidad equivalente en las condiciones particulares de uso”. La Tabla 1 se presenta algunas propiedades físicas de estos compuestos.

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se estudiaron los COV que se indican en la Directiva 2008/105/CE (Figura 20). La inquietud que genera la presencia de estos contaminantes en el medio se debe a los efectos adversos que provocan tanto en el ser humano como en el medio ambiente. Estos compuestos contribuyen de manera significativa a la aparición de smog, e incluso algunos de ellos son conocidos carcinógenos, como el benceno.

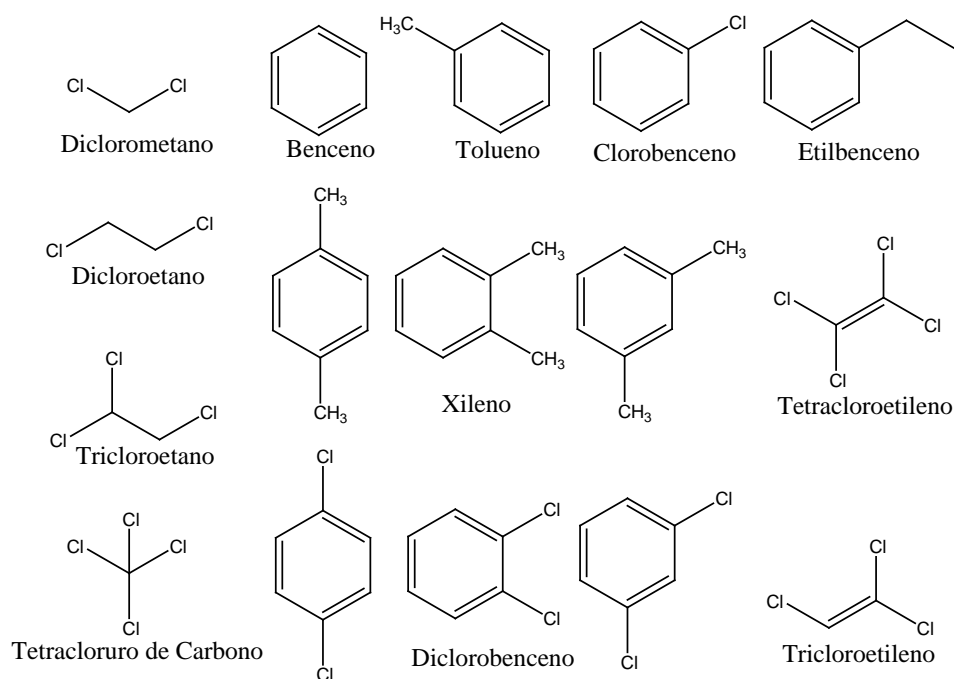


Figura 20. Estructura de algunos COV

A nivel estatal existen dos Decretos que regulan la presencia y emisión de estos compuestos. Real Decreto 117/2003, de 31 de enero, sobre limitación de emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes en determinadas actividades, y Real Decreto 227/2006, de 24 de febrero, por el que se complementa el régimen jurídico sobre la limitación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles en determinadas pinturas y barnices y en productos de renovación del acabado de vehículos. Por otro lado, estos

compuestos están regulados por la UE por la Directiva 2004/42/CE por la que se limitan las emisiones de COV.

1.3.6 FTALATOS

Los ftalatos son una familia de compuestos derivados del ácido ftálico. Se trata de ésteres que generalmente van unidos a cadenas alifáticas (Figura 21). Poseen baja solubilidad en agua, baja volatilidad y elevada solubilidad en lípidos (Tabla 1) y debido a estas propiedades son utilizados para el recubrimiento de plásticos y gomas. Entre los distintos polímeros el más utilizado es el Dietilhexilftalato o DEHP (Figura 21), especialmente utilizado para el recubrimiento de PVC, entre otros usos.

Según la IARC el DEHP se clasifica en el grupo 3, como “no clasificable” al carecer de adecuadas evidencias de carcinogenicidad (año 2000), además ha sido catalogado como disruptor endocrino por su efecto tóxico en el proceso reproductivo y de desarrollo.

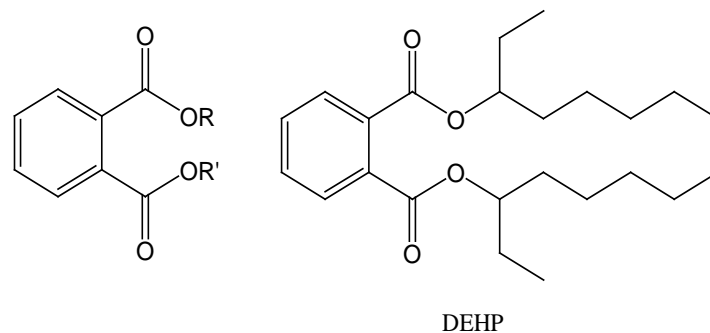


Figura 21. Estructura general de ftalatos y DEHP

Su presencia en productos cosméticos está prohibida por el Reglamento 1223/2009/CE. Por otro lado, la Directiva 2005/84/CE restringe su uso en plásticos de juguetes a concentraciones menores al 0.1 % en masa.

1.3.7 HERBICIDAS TIPO TRIAZINAS Y TRIFLURALINA

Los herbicidas derivados de la triazina forman una amplia familia, todos ellos se caracterizan por su acción como inhibidores de la fotosíntesis de determinadas hierbas. En el desarrollo de este trabajo de tesis se han estudiado los compuestos que se indican en la Figura 22.

En cuanto a su toxicidad, la simazina es un conocido disruptor endocrino, además diferentes estudios lo clasifican como un posible agente carcinógeno. Por otro lado, se ha observado que la atrazina es un agente teratógeno para el medio acuático.

Algunos de ellos tienen prohibidos sus usos en la UE, como la simazina que tras ser extensamente usada desde 1956 ha sido recientemente prohibida y excluida del anexo I de la Directiva 91/414/CE. El uso de estas sustancias está prohibido en la UE como fitosanitarios, han sido excluidas en la última década de la Directiva 91/414/CE por diferentes Reglamentos.

La trifluralina, que es un derivado de la anilina, debido a sus propiedades químicas puede actuar, al igual que las triazinas, como inhibidor del proceso de fotosíntesis, por lo que ha sido generosamente utilizado como herbicida para el control de la maleza.

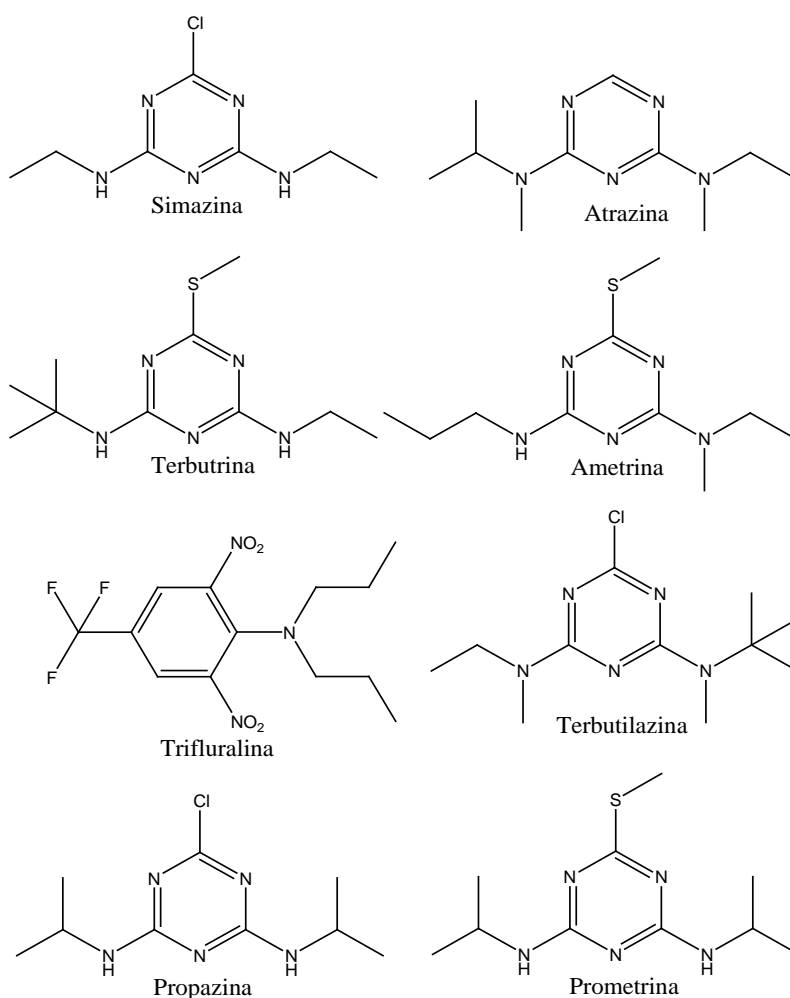


Figura 22. Estructura de herbicidas tipo triazinas

Es un compuesto muy tóxico para el medio ambiente, persistente en el medio y no fácilmente biodegradable, por lo que su uso está prohibido desde 2008, por la Decisión de la Comisión 2007/629/CE, relativa a la no inclusión de la trifluralina en el Anexo I de la Directiva 91/414/CE.

1.3.8 HERBICIDAS TIPO UREA

Los herbicidas tipo urea, son compuestos aromáticos que tienen como sustituyente un grupo urea. En la Figura 23 se representa la estructura de las sustancias estudiadas en este trabajo.

Estos compuestos, al igual que ocurre con los derivados de la triazina, poseen la capacidad para actuar como inhibidores de la fotosíntesis. Actúan bloqueando la plastoquinona, y por consiguiente el flujo de electrones impidiendo que las plantas puedan transformar en energía la luz absorbida. Por ellos, se han utilizado durante décadas como herbicidas. El DCMU, más conocido como diuron, fue introducido en el mercado en 1954 por Bayer.

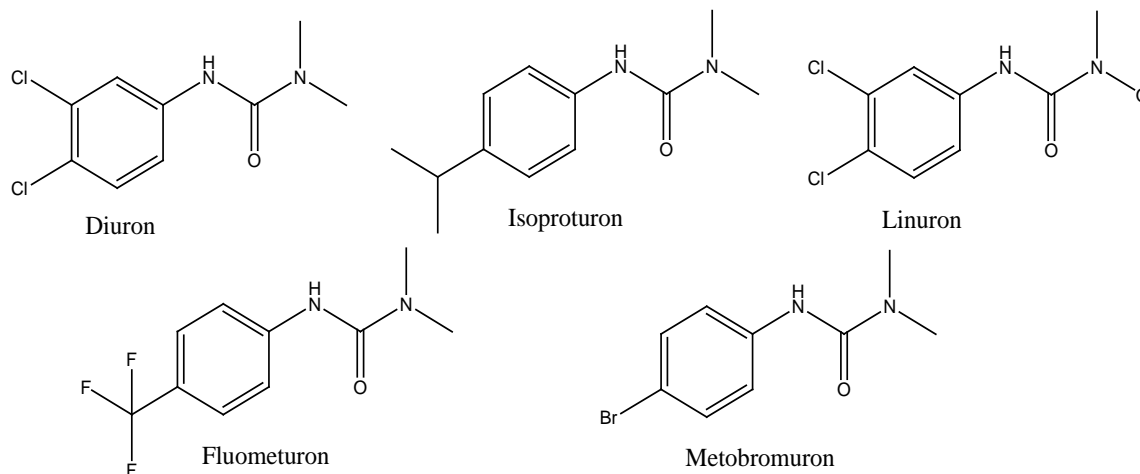


Figura 23. Estructura de herbicidas tipo urea

Estos compuestos son tóxicos para el ser humano, se ha observado alteración de órganos internos como bazo o riñón, ligeras anemias o cambios en la médula ósea, entre otros. No se ha observado que tengan actividad teratogénica pero si se relaciona su presencia con el aumento de algunos tipos de tumores. En el medio ambiente resultan altamente tóxicos, especialmente para el medio acuático.

El Reglamento 504/2011/CE restringe el uso de diuron e isoproturon, limitando su uso como herbicidas, siendo la concentración máxima permitida para diuron de 0.5% Kg/ha. Al igual que los anteriores, el fluometuron sólo puede ser utilizado como herbicida, como se indica en la Directiva de ejecución 2011/57/CE. Por otro lado, el metobromuron se ha considerado para ser incluido en el Anexo I de la Directiva 91/414/CE, y el linuron está incluido en la Directiva 76/464/CE como sustancia peligrosa pero actualmente no tiene prohibidos sus usos.

1.3.9 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los pesticidas organofosforados son compuestos aromáticos que poseen un fosfato como sustituyente. En este trabajo nos centraremos en el clorfenvinfos y el clorpirifós (Figura 24), ambos han sido largamente utilizados como pesticidas desde su introducción en el mercado, 1963 para el clorfenvinfos y 1965 para el clorpirifós.

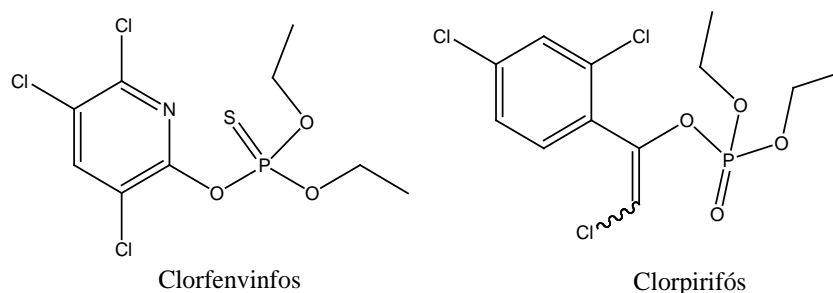


Figura 24. Estructura de pesticidas organofosforados

Estos pesticidas actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa, lo que provoca un exceso de acetilcolina en el organismo, que resulta tóxico para el sistema nervioso central no sólo para insectos sino que también para mamíferos.

El uso de estos compuestos está restringido, el clorpirifós tiene prohibido su uso en cultivos desde 1991, pero tiene permitido su uso como pesticida hasta el 31 de enero de 2018. El clorfenvinfos está excluido del Anexo I de la Directiva 91/414/CE según el Reglamento 2076/2002/CE, el cual permitía su uso sólo como pesticida hasta junio del 2007.

Tabla 1. *Propiedades físico-químicas de las sustancias prioritarias*

	Compuesto	Pf (°C)	Peb (°C)	Pv (Tª) (mmHg)	log Kow	solubilidad (mg/L)	d (g/cm³)
Parafinas	SCCP	nd	nd	nd	5.06-8.12	0.15-0.7	1.2-1.6
Organoestánicos	MBT	-63	93	0.77	0.41	nd	1,693
	DBT	39	135	nd	0.97	320	1.4
	TBT	63	208	0.18	4.15	6	1.2
	MPhT	108	397	$4 \cdot 10^{-6}$	nd	nd	1.49
	DPhT	41	333	nd	nd	nd	nd
	TPhT	63	208	0.18	4.15	6	1.69
Fenoles y alquifenoles	Fenol	40.5	nd	0.65	1.46	$8.4 \cdot 10^4$	1.07
	o-Cresol	31	191	nd	2.2	$2.6 \cdot 10^3$	nd
	2-Clorofenol	nd	nd	nd	2.15	$2.85 \cdot 10^4$	1.24
	BPA	150-155	nd	nd	nd	nd	nd
	t-nonilfenol	2	295	0.75	3.28	3000	0.95
	Octilfenol	80.5	277	$1.6 \cdot 10^{-3}$	4.12	19	0.94

nd. No disponible

Tabla 1.Bis. Propiedades físico-químicas de las sustancias prioritarias

	Compuesto	Pf (°C)	Peb (°C)	Pv (Tª) (mmHg)	log Kow	solubilidad (mg/L)	d (g/cm³)
Organohalogenados	Alacloro	38	400	$1,6 \cdot 10^{-5}$	3.5	200	1.1
	Endosulfán	70-100	nd	$3-7.5 \cdot 10^{-5}$	3.55-3.62	nd	1.75
	Aldrín	104	145	$7.5 \cdot 10^{-5}$	7.4	nd	1.6
	Dieldrín	177	385	$9 \cdot 10^{-7}$	6.2	nd	1.75
	Endrín	112.5	descompone	$2 \cdot 10^{-7}$	5.6	nd	1.7
	Isodrín	240.6	descompone	$4.4 \cdot 10^{-5}$	6.75	nd	nd
	αHexaclorociclohexano	158	288	$4.5 \cdot 10^{-5}$	3.8	nd	1.87
	βHexaclorociclohexano	309	60	$3.6 \cdot 10^{-7}$	3.78	nd	1.89
	δHexaclorociclohexano	112.5	323.4	$4.2 \cdot 10^{-5}$	3.72	nd	1.85
	γHexaclorociclohexano	141.5	60	$3.5 \cdot 10^{-5}$	4.14	nd	nd
	Hexaclorobutadieno	-21	215	$1.5 \cdot 10^{-5}$	4.75	2.6	$1.556 \cdot 10^3$
	Hexaclorobenceno	231	323-326	$1.6 \cdot 10^{-5}$	6.2	nd	1.21
	Pentaclorobenceno	86	275-277	150	5.03-5.63	nd	1.8
	Pentaclorofenol	191	309	$1.5 \cdot 10^{-5}$	5.01	10	1.98
	1,2,3-Triclorobenceno	53	222	0.29	4.05	nd	1.45
	1,2,4-Triclorobenceno	16.9	214.4	0.3	3.98	34.6	1.5
	1,3,5-Triclorobenceno	63	208	0.18	4.15	6	1.69
DDT	109	260	nd	6.37	nd	1.5	
PBDE	-7	200-300	$1 \cdot 10^{-7}$	6.57	13	2.28	
HAPs	Antraceno	218	342	$1,7 \cdot 10^{-5}$	4.15	$2.4 \cdot 10^{-4}$	1.25
	Naftaleno	80	218	0,082	3.37	$1.25-3.4 \cdot 10^3$	1.16
	Fluoranteno	110.8	375	$5 \cdot 10^{-6}$	4.9	26	1.25
	Benzo(ghi)perileno	278	550	$1 \cdot 10^{-10}$	6.78	$2.6 \cdot 10^{-4}$	nd
	Benzo(a)pireno	178	496	$5.5 \cdot 10^{-9}$	6.06	$2.3 \cdot 10^{-3}$	1.4
	Benzo(b)fluoranteno	168	481	$9,59 \cdot 10^{-11}$	6.12	$6,3 \cdot 10^{-3}$	nd
	Benzo(k)fluoranteno	217	480	$9,59 \cdot 10^{-11}$	6.84	$7.6 \cdot 10^{-4}$	nd
indeno(1,2,3)pireno	164	536	$1 \cdot 10^{-6}$	6.58	0.062	nd	
VOCs	Diclorometano	-95.1	40	3600	1.25	$1.3 \cdot 10^3$	1.3
	Tolueno	-95	111	29	2.69	$0.515 \cdot 10^3$	0.871
	o-Xileno	-25	144	5.3	3.12	nd	0.87
	m-Xileno	-48	139	6	3.2	nd	0.86
	Tricloroetileno	-73	87	59	2.42	$1 \cdot 10^3$	1.5
	Tetracloroetileno	-22	121	14	2.9	$0.15 \cdot 10^3$	1.6
	Etilbenceno	-95	136	6.8	3.1	$0.15 \cdot 10^3$	0.9
	1,1,1-Tricloetano	-30	74	100	2.49	nd	1.34
	Benceno	6	80	75	2.13	$1.8 \cdot 10^3$	0.88
	Tetracloruro de Carbono	-23	76.5	92	2.64	$1 \cdot 10^3$	1.59
	Clorobenceno	-45	132	8.6	2.18-2.84	$0,5 \cdot 10^{-3}$	1.11
	1,2-Dicloroetano	-35.7	83.5	65	1.48	$8.7 \cdot 10^3$	1.235
	1,2-Diclorobenceno	-17	180-183	1.2	3.38	nd	1.3
	1,3-Diclorobenceno	-24.8	153	2.1	3.53	nd	1.288
1,4-Diclorobenceno	53	174	1.3	3.37	80	1.2	
Triclorometano	-64	62	1600	1.97	$8 \cdot 10^3$	1.48	
Ftalatos	DEHP	50	230	$2.5 \cdot 10^{-7}$	7.5	0.285	0.2
Triazinas	Simazina	225-227	nd	$6.5 \cdot 10^{-9}$	4.7	5	nd
	Atrazina	175	nd	nd	2.34	70	1.18
	Terbutrina	104	154-160	nd	nd	25	nd
	Ametrina	84-85	nd	$3 \cdot 10^{-7}$	2.83	280	nd
	Terbutilazina	178-179	nd	$5.8 \cdot 10^{-7}$	3.21	$1.15 \cdot 10^3$	1.08
	Prometrina	nd	nd	nd	3.51	nd	nd
	Propazina	212-214	nd	$2.9 \cdot 10^{-6}$	nd	8.6	nd
Trifluralina	46-47	139-141	$1.1 \cdot 10^{-4}$	5.07	24	nd	
Ureas	Diuron	158	180	$8.3 \cdot 10^{-9}$	2.85	42	1.48
	Fluometuron	163-164	nd	nd	nd	90	1.39
	Linuron	93-94	nd	$1.5 \cdot 10^{-5}$	3.2	nd	nd
	Isoproturon	153	nd	$2.8 \cdot 10^{-8}$	nd	70	1.16-1.18
Fosforados	Metobromuron	nd	nd	nd	2.5	nd	nd
	Clorfenvinfós	-19	167-170	$7.5 \cdot 10^{-6}$	3.83	nd	1.36
	Clorpirifós	42	nd	nd	4.96	2	1398

nd. No disponible

1.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

La estimación de sustancias prioritarias en muestras ambientales es complicada debido a la complejidad de la matriz de las muestras y al bajo nivel de concentración al que se encuentran estos contaminantes. Generalmente, se emplean técnicas de separación cromatográficas, entre éstas, las más empleadas son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinadas con distintos detectores

En este tipo de muestras es habitual el uso de técnicas de extracción previas a las técnicas de análisis o de separación. Las más empleadas son la extracción líquido-líquido (LLE) (Wurl et al., 2005), la extracción en fase sólida (SPE) (Öellers et al., 2001; Heberer et al., 1998) y la microextracción en fase sólida (SPME) (Gonçalves et al., 2004).

Algunos compuestos, debido a sus características químicas, necesitan además un tratamiento previo al análisis como puede ser la derivatización que consiste en la transformación de un compuesto químico en otro con propiedades adecuadas (punto de fusión, punto de ebullición, reactividad, estado de agregación o composición química) para su análisis.

1.4.1 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

La extracción líquido-líquido ha sido ampliamente usada para muestras acuosas, sin embargo, requiere elevados volúmenes de disolvente, generalmente tóxicos, por lo que en los últimos años se ha ido sustituyendo por la extracción en fase sólida (SPE).

La SPE es la técnica más utilizada, debido a que es muy versátil, pudiendo ser utilizada tanto para cromatografía gaseosa como para cromatografía líquida. Los tiempos necesarios para la extracción son cortos, los volúmenes de disolvente orgánico empleados son reducidos y no necesita una gran cantidad de muestra en comparación con la extracción líquido-líquido. Por otro lado, permite el análisis de gran variedad de analitos (Moeder et al., 2000). La SPE se basa en la afinidad de los solutos disueltos o suspendidos en una determinada matriz líquida (fase móvil) y un sorbente (fase estacionaria). La fase móvil se hace pasar a través de la fase estacionaria y posteriormente los analitos retenidos son eluidos con un disolvente orgánico adecuado. Se comercializan en forma de cartuchos o de discos que contienen distintos tipos de sorbentes, siendo los más utilizados el octadecilsilano (C₁₈) y los sorbentes poliméricos como el poliestireno-divinilbenceno.

Sin embargo, esta técnica también presenta limitaciones, ya que para poder emplearla siguiendo un protocolo, analítico la muestra debe estar correctamente homogeneizada en estado líquido.

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado otras técnicas de extracción más novedosas que proporcionan buenas recuperaciones para los analitos de estudio. Como la microextracción en fase sólida o la dispersión de la matriz en fase sólida desarrolladas en las últimas décadas, o técnicas más conocidas como la extracción asistida por ultrasonidos. Todas ellas se detallan a continuación.

1.4.1.1 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida o *solid phase microextraction* (SPME), fue desarrollada en el año 1989 por Pawliszyn (Peñalver, 2002). Son muchos los trabajos que utilizan la SPME como técnica de extracción, especialmente para el análisis de trazas, ya que ofrece grandes ventajas sobre la SPE. Es una técnica muy simple, no requiere grandes volúmenes de muestra, no precisa el uso de disolventes orgánicos, puede utilizarse tanto para GC como para LC y posee un bajo coste. En la Figura 25 se presenta un dispositivo de SPME comercial.

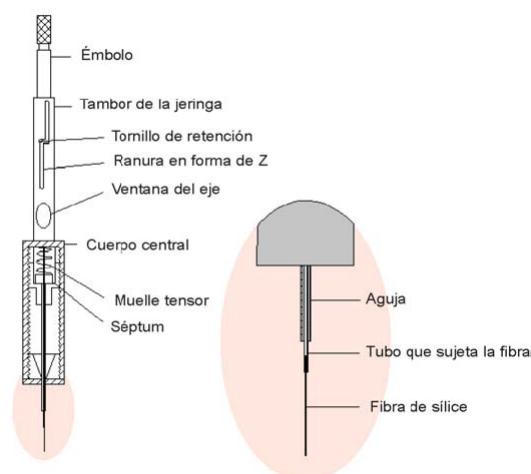


Figura 25. Esquema del dispositivo comercial de SPME

La extracción de los analitos se puede llevar a cabo de dos formas, la microextracción por inmersión directa de la fibra dentro de la disolución (DM-SPME, direct mode) o la microextracción en el espaciado de cabeza (HS-SPME, headspace).

La fibra puede estar recubierta por distintos materiales poliméricos de distinto grosor de capa en función del tipo de compuesto que se pretende analizar. Dependiendo del polímero que se utilice, los analitos pueden ser extraídos por absorción o por adsorción.

Las fibras de polidimetilsiloxano (PDMS), que es un polímero líquido y no polar, se pueden encontrar generalmente en tres grosores diferentes (100, 30 y 7 μm). Estas fibras se utilizan para compuestos volátiles o semivolátiles y no polares o poco polares, y se pueden

emplear tanto en GC como en HPLC. El poliacrilato (PA) es un polímero líquido y polar que se emplea para compuestos polares semivolátiles, y son utilizadas tanto para GC como para HPLC. Ambos polímeros extraen los analitos por absorción (Chafer Pericas, 2006).

Otros polímeros están formados por mezclas de capas en las que la fase primaria de extracción es un sólido, este tipo de polímeros extraen los analitos por adsorción. El polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) es bipolar, es utilizado para análisis de compuestos polares volátiles o semivolátiles tanto en GC como en HPLC. Se puede encontrar con distintos grosores, cada uno de ellos indicado para un tipo de análisis (Gonçalves y Alpendurada, 2002). El carboxen-polidimetilsiloxano (Carboxen-PDMS), que es bipolar, es empleado para la determinación de compuestos gaseosos o volátiles mediante GC. El Carbowax-divinilbenceno (Carbowax-DVB), polar, se emplea en el análisis de compuestos polares mediante GC. El Carbowax-TPR es una fibra polar, utilizada para el análisis de compuestos tensioactivos mediante HPLC. El DVB-PDMS-Carboxen es una mezcla bipolar, empleada en el análisis de compuestos volátiles mediante GC.

En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica de extracción, SBSE (stir bar sorptive extraction), cuyo mecanismo de extracción es similar al de la SPME. Estas barras, al igual que sucede en la SPME, están recubiertas por polímeros capaces de absorber o adsorber a los analitos. Esta nueva técnica se ha empleado para el análisis de diversos contaminantes en aguas (Pérez-Carrera et al., 2007).

El modelo matemático que explica la dinámica de absorción fue desarrollado por Louch et al. (1992). El proceso de SPME se considera completado cuando existe un equilibrio entre la concentración de analito en la matriz y en la fibra. Esta condición de equilibrio se describe como:

$$n = \frac{K_{fs}V_fC_oV_s}{K_{fs}V_f+V_s} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde n es el número de moles absorbidos en la fibra y C_o es la concentración inicial de un determinado analito, V_s y V_f de los volúmenes de muestra y de fibra respectivamente y K_{fs} el coeficiente de partición entre la fibra y la muestra.

Si se asume que el volumen de muestra es mucho mayor que el volumen de fibra se llega a la siguiente aproximación:

$$n = K_{fs}V_fC_o \quad \text{Ecuación 2}$$

Posteriormente, fue desarrollado el modelo matemático para una extracción en espaciado de cabeza, por Zhang y Pawliszyn (1993). En este caso se debe tener en cuenta una tercera fase que será la fase gaseosa, por lo que la concentración inicial será igual a la concentración final en cada una de las tres fases

$$C_o V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad \text{Ecuación 3}$$

donde C_f^∞, C_h^∞ y C_s^∞ representa las concentraciones en equilibrio en cada una de las fases y V_f, V_h y V_s representa los volúmenes de sorbente, espaciado de cabeza y disolución respectivamente. De modo que, si definimos las constantes de distribución entre el sorbente y el gas ($k_{fh} = C_f^\infty / C_h^\infty$) y la constante de distribución entre gas y disolución ($k_{fs} = C_f^\infty / C_s^\infty$), reajustando la Ecuación 2 a las tres fases queda:

$$n = \frac{C_o V_f V_s K_{fh} K_{hs}}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Ecuación 4}$$

si consideramos que el coeficiente de partición entre fibra y disolución (k_{fs}) es igual al producto entre el coeficiente de partición fibra-espaciado de cabeza (k_{fh}) y coeficiente de partición espaciado de cabeza-disolución (k_{hs}), $k_{fs} = k_{fh} k_{hs}$, podemos reescribir la ecuación 4 como:

$$n = \frac{C_o V_f V_s K_{fs}}{K_{fs} V_{fh} + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Ecuación 5}$$

K_{hs} (coeficiente de partición entre el espaciado de cabeza y la disolución) suele ser relativamente pequeña para la mayoría de los analitos y si asumimos que el volumen de fibra es menor que el volumen de muestra ($V_f \ll V_s$) y que el volumen de espaciado de cabeza es menor que el de muestra ($V_h \ll V_s$), se concluye que:

$$n = K_{fs} V_f C_o \quad \text{Ecuación 6}$$

La dinámica del proceso de adsorción fue desarrollada por Gorecky et al. (1999) para polímeros porosos. La relación entre la concentración de analito asociado a un adsorbente y la concentración de éste en disolución obedece a la isoterma de Langmuir. Se trata de un proceso de quimisorción en monocapa donde la cantidad adsorbida aumenta con la presión hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie por una monocapa. La condición de equilibrio se define como:

$$n = \frac{K_A V_f C_o V_s (C_{max} - C_{fA}^\infty)}{V_s + K_A V_f (C_{max} - C_{fA}^\infty)} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde K_A es la constante de adsorción en el equilibrio, C_{max} es la concentración máxima de analito que puede haber en la fibra y C_{fA}^∞ es la concentración en el equilibrio de analito en la fibra.

En este proceso, al igual que para la absorción, se debe tener en cuenta la fase gas. La concentración de analito en el equilibrio en el espaciado de cabeza viene dada por la ley de

Henry, por lo que si se define K'_A como el producto de la constante de Henry (K_{HA}) y K_A para el espaciado de cabeza se concluye:

$$n = C_{fA}^{\infty} V_f = \frac{K'_A C_{OA} V_s V_f (C_{max} - C_{fA}^{\infty})}{V_s + V_h K_{HA} + V_h K'_A (C_{max} - C_{fA}^{\infty})} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde V_h es el volumen del espacio de cabeza. Esta ecuación tiene un término adicional en el denominador ($V_h K_{HA}$).

La extracción en el espaciado de cabeza puede resultar útil en aquellos casos en que los analitos sean muy volátiles. Además, puede resultar muy útil cuando se trabaja con muestras sólidas o la matriz es muy compleja, como en muestras biológicas (Arambarri et al., 2003; Bravo et al., 2004). Sin embargo, presenta algunas desventajas en el análisis de trazas, ya que en aquellos compuestos de baja volatilidad los tiempos de extracción podrían ser muy largos y las extracciones muy pobres.

El proceso de extracción se puede favorecer modificando la cinética del proceso, modificando los parámetros que influyen:

- El tiempo de extracción es uno de los más importantes. Cada compuesto en función del tipo de fibra empleada tiene un tiempo óptimo. Es muy importante conocer este tiempo de extracción óptimo, ya que una pequeña variación del tiempo de extracción puede modificar considerablemente la cantidad de analito extraído.

- El volumen de muestra, ya que cuanto mayor es el volumen de muestra mayor cantidad de analito hay disuelto en ella, que podrá ser extraído.

- La temperatura de extracción es otro parámetro a tener en cuenta. Al aumentar la temperatura se aumentan los coeficientes de difusión de los analitos en la matriz, con lo que se favorece la extracción. Por otro lado, si aumentamos en exceso la temperatura podemos, simultáneamente, dar lugar a la desorción de los analitos. Cuando se trabaja en HS-SPME el aumento de la temperatura puede mejorar la extracción, ya que aumenta la concentración de los analitos más volátiles en el espaciado de cabeza.

- La velocidad de agitación también puede influir en la difusión de los analitos hasta la fibra o hasta el espaciado de cabeza.

- La salinidad de la muestra juega un papel importante ya que la presencia de sal aumenta la fuerza iónica de la matriz, disminuyendo la solubilidad de algunos analitos.

- El espaciado de cabeza, si se trabaja de este modo hay que considerar que cuanto mayor sea este volumen, los analitos se encontrarán en menor concentración.

- El pH es otro factor que puede influir en la extracción. En compuestos con valores de pKa altos un valor de pH bajo puede favorecer la extracción, sin embargo, en compuestos con un pKa intermedio los valores de pH mejorarán la calidad de la extracción.

1.4.1.2 Dispersión de la matriz en fase sólida

A finales de los años 80 se desarrolló una técnica que permitía la extracción de analitos de muestras sólidas, semisólidas o viscosas, esta técnica es denominada dispersión de la matriz en fase sólida o *matrix solid-phase dispersión* (MSPD). La MSPD consiste en la mezcla de la matriz con un soporte sólido orgánico, que coincide con los soportes sólidos empleados para SPE. Este soporte sólido servirá para romper los enlaces de la materia orgánica y de esta forma liberar los analitos, que posteriormente serán eluidos con un disolvente orgánico adecuado. La MSPD al igual que SPE se basa en los principios físicos de la cromatografía líquida.

En MSPD generalmente se emplea fase reversa y, al igual que en SPE, C₁₈ y C₈ son las fases más empleadas. Uno de los inconvenientes más comunes, tanto en SPE como en MSPD, es que la fase enlazada deber ser prelavada para eliminar las interferencias y acondicionada con el solvente antes de mezclar con la muestra.

En la recuperación de los analitos juega un papel muy importante la matriz de la muestra, ya que en la extracción pueden coeluir diferentes compuestos. En los casos en los que la matriz pueda contener interferencias que puedan ser coeluidas con los analitos, será necesario eliminarlas previamente empleando diferentes solventes, considerando las interacciones entre la fase sólida y la matriz dispersa.

En algunos casos es necesario modificar el estado de ionización de los analitos en la matriz, algo que se puede solucionar con la adición de ácidos, sales u otros agentes.

La relativa polaridad tanto del solvente elegido para la elución como de los analitos puede influir en la recuperación de éstos de la matriz. Como ya se ha comentado es importante considerar las posibles interferencias de la matriz sólida, ya que pueden ser coeluidas con los analitos de interés. En aquellos casos que sea necesario, habrá que realizar una secuencia de elución empleando solventes de diferente polaridad para eluir previamente las interferencias.

1.4.1.3 Extracción asistida con ultrasonidos

La extracción por ultrasonidos se basa en que las ondas sonoras son transmitidas a través de cualquier sustancia sólida, líquida o gaseosa que posea propiedades elásticas. El movimiento de vibración es transmitido de una molécula a su contigua, generando ciclos de expansión y compresión. Las ondas de ultrasonido son lo suficientemente fuertes como para generar burbujas o cavidades dentro de un líquido, de forma que la presión ejercida puede llegar a

explosionar dichas burbujas. Este fenómeno denominado cavitación favorece y acelera la extracción de los analitos de la muestra sólida.

Esta técnica ha sido empleada por diferentes autores para la extracción de pesticidas y compuestos organoestánicos de muestras de biota (Vagi et al. 2007; Casi et al. 2002). El empleo de ultrasonidos permite la extracción con pequeñas cantidades de solvente, y permite reducir el tiempo de extracción con respecto a otras técnicas como Soxhlet.

1.4.1.4 Extracción asistida con microondas

En química analítica comenzó a utilizarse la extracción con microondas en los años 70. Esta técnica ha sido muy utilizada en los últimos años para sustituir al tradicional Soxhlet, ya que requiere menos tiempo de extracción y menores volúmenes de solvente. La extracción asistida por microondas es una técnica muy empleada en los últimos años para la extracción de diferentes compuestos halogenados de muestras orgánicas y sedimentos (Üvegues et al. 2007; Peris et al. 2005).

La acción directa de las ondas sobre un material permite que parte de la energía electromagnética sea absorbida por éste y transformada en calor. Esta técnica se basa en utilizar las microondas para calentar los disolventes que se encuentran en contacto con la muestra, de forma que los analitos de interés sean extraídos de la matriz, quedando retenidos en el disolvente o extractante. El calor se puede generar por dos mecanismos diferentes: i) conducción iónica, el calor se genera por la colisión de las moléculas que cambian su dirección con la dirección del campo; ii) rotación del dipolo, las moléculas que poseen dipolo eléctrico tratan de alinearse con el campo eléctrico generando calor debido a las colisiones.

En el proceso de extracción influyen los siguientes factores: potencia, temperatura y tiempo de exposición. Están relacionadas, ya que generalmente cuanto mayor es la potencia mayor es la temperatura y menor es el tiempo de exposición necesario para la extracción. No obstante, el aumento de la potencia no siempre puede resultar favorable, ya que puede provocar la degradación de la muestra o de los analitos, y en aquellos casos en los que se empleen recipientes abiertos, la volatilización del disolvente. La temperatura, al igual que la potencia, puede afectar a la extracción si es muy elevada, ya que puede degradar la muestra y los analitos.

Generalmente los analitos que se desean extraer son compuestos orgánicos, por lo que los disolventes más indicados son de tipo orgánico como el n-hexano. Sin embargo, estos disolventes suelen tener dipolo eléctrico bajo o nulo por lo que es necesario el empleo de mezclas de disolventes como n-hexano: acetona.

1.4.2 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

Hasta mediados del siglo XX, las técnicas de separación más empleadas estaban basadas en métodos clásicos como precipitación, destilación y extracción. En el año 1902 el botánico ruso Mikhail S. Tswett propuso el primer método cromatográfico basado en la separación en la fase líquida, que le permitió separar los pigmentos vegetales, debido a que éstos se separaban en bandas de colores lo llamó *cromatografía*. Sin embargo, hasta el año 1952 no se demostró experimentalmente la importancia de la cromatografía. Archer J.P. Martin y Richard L.M. Synge fueron galardonados con el Premio Nobel de Química por su trabajo en la cromatografía de reparto líquido-líquido. Posteriormente, Archer J. P. Martin y Anthony T. James desarrollaron la cromatografía gas-líquido, conocida como cromatografía de gases.

La cromatografía se puede aplicar a todas las ramas de la ciencia, es una técnica analítica de separación que se basa en la afinidad de los analitos de la muestra con la fase estacionaria. Cuanto mayor sea la afinidad de los analitos por la fase estacionaria más tiempo tardarán en ser arrastrados por la fase móvil, de modo que este tiempo, tiempo de retención, será el que defina de qué compuestos se trata, se considera la variable cualitativa.

Tabla 2. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

Clasificación	Fase móvil	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases	gaseosa	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
		Gas-sólido	Sólido	Adsorción
		Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la especie enlazada
Cromatografía líquida	líquida	Líquido-líquido (reparto)	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
		Líquido-sólido (adsorción)	Sólido	Adsorción
		Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la especie enlazada
		Exclusión	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución o reparto
		Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
Cromatografía de fluidos supercríticos	fluido supercrítico		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada

A lo largo del siglo XX la cromatografía en columna ha evolucionado, desarrollándose distintos tipos. En la Tabla 2 se destacan las características principales de cada uno de sus tipos. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas cromatográficas como la *cromatografía líquida micelar* (MLC) o la cromatografía micelar electrocinética (MEKC) que se basan en el uso de tensioactivos en la fase móvil (Molina et al., 2007).

1.4.2.1 Cromatografía gaseosa

El desarrollo de la cromatografía de gases supuso un paso revolucionario en el campo de la química analítica para la separación de compuestos volátiles. Existen dos tipos de cromatografía de gases: gas-sólido (GSC) y gas-líquido (GLC o GC). Esta última es extensamente empleada en muchos campos de la ciencia.

La cromatografía gas-sólido se basa en la adsorción física de los analitos en la fase estacionaria, aunque este tipo de cromatografía está muy limitado ya que los analitos polares o activos pueden quedar retenidos de forma semipermanente. En cambio, la cromatografía gas-líquido, utilizada en este trabajo, es una técnica muy versátil, se basa en la distribución de los analitos entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre un sólido inerte.

Uno de los detectores empleados en este estudio para el análisis de compuestos organohalogenados es el detector de captura de electrones. El funcionamiento de este detector se basa en la ionización del gas portador, procedente de la columna a su paso por un emisor β (Niquel-63). Este emisor, al ionizar el gas portador, genera una corriente de electrones que, al aplicar un campo eléctrico, pasan a través de un par de electrodos generando una señal. En presencia de moléculas orgánicas que contengan elementos electronegativos, estos retienen parte de la corriente de electrones de modo que genera una disminución en la señal (Figura 26a).

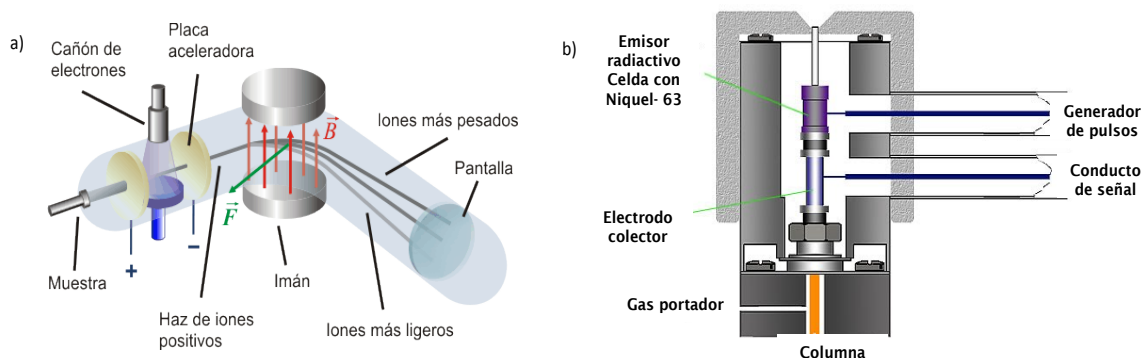


Figura 26. Esquema de un detector: a) espectrometría de masas; b) de captura de electrones

Este detector es muy sensible a compuestos que contengan grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas o grupos nitro, aunque es insensible para aminas, alcoholes e hidrocarburos. Otra de las ventajas que ofrece este detector es que no altera significativamente la muestra. Como desventaja, el intervalo de respuesta lineal se limita a uno o dos órdenes de magnitud. La cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones ha sido muy utilizada para el análisis de pesticidas halogenados, permitiendo trabajar

con límites de detección del orden de ng/L (Ratola et al., 2006; Brás et al., 2000) o incluso pg/L (Raposo et al., 2007).

Otro de los detectores de cromatografía gaseosa más empleado en este tipo de análisis es el detector de masas, en la Figura 26b se ofrece un esquema del mismo. Este detector presenta diversas ventajas frente a otros detectores. Al permitir trabajar en modo SIM (simple ion monitoring) posee una sensibilidad elevada, además ofrece un amplio intervalo de respuesta lineal de varios órdenes de magnitud. En la descripción de este detector, podemos destacar distintas partes que juegan un papel importante:

–*Fuente de iones.* A la fuente iones es dónde llega el efluente procedente de la columna. Los analitos son bombardeados con partículas de elevada energía cinética de modo que se ionizan, y son transportados hasta el analizador. La ionización puede ser por impacto de electrones (EI) o química cuando se trabaja con gases y vapores.

–*Analizador de masa.* El analizador de masas más empleado es el cuadrupolo, que consiste en cuatro barras metálicas que actúan como electrodos. Se aplica un campo magnético y eléctrico de modo que los iones generados se van desplazando, la velocidad de este desplazamiento dependerá fundamentalmente de la relación masa/carga (m/z) de cada analito. De esta manera, los analitos con menor relación m/z llegarán al cuádruplo a mayor velocidad, pudiendo así separarse para su posterior análisis.

Algunos autores trabajan acoplado espectrometría de masas a la CG, obteniendo límites de detección para plaguicidas organoclorados entre 2-60 ng/L (Gonçalves y Alpendurada, 2004). Yang et al., 2006 trabajaban el análisis de hormonas mediante GC-MS-MS de manera que se logran límites de detección entre 3-100 ng/L.

1.4.2.2 Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una técnica muy utilizada para el análisis de compuestos poco volátiles o compuestos termolábiles, en cuyo caso resulta inviable su determinación por cromatografía gaseosa.

Una tendencia actual del análisis químico es la simplificación y miniaturización de los procesos analíticos. En la década de los años 60 comenzaron a desarrollarse las técnicas miniaturizadas (Smith et al., 2005). Aplicación importante en el análisis de trazas para mejorar la especificidad, sensibilidad y precisión cromatográfica. Estos sistemas resultan atractivos por varias razones: alta velocidad de análisis, bajo coste de operación, bajo consumo de solvente. Además, ofrecen un aumento de la sensibilidad y por tanto la preconcentración necesaria es menor. En la Tabla 3 se destacan las características de los tipos de cromatografía líquida miniaturiza: micro-, capilar- y nano-LC.

Tabla 3. *Características de los distintos técnicas de cromatografía líquida miniaturizada*

Tipo de cromatografía	Diámetro interno columna	Longitud columna	Caudal
HPLC convencional	3-5mm	5-15 cm	0,5-3 ml/min
Micro-LC	500 μ m-1 mm	5-15 cm	10-100 μ l/min
Capilar-LC	100-500 μ m	15-25 cm	1-15 μ l/min
Nano-LC	75-100 μ m	3-5 cm	200-500 nI/min

La Cromatografía líquida capilar (capilar LC) surgió alrededor de los 80 pero se ha desarrollado en los últimos años dada la carencia de buena instrumentación. Esta técnica de miniaturización, que trabaja con columnas de entre 0.1-0.5mm de diámetro interno, presenta ventajas frente a la cromatografía líquida convencional permitiendo trabajar con caudales y volúmenes de inyección bajos. Sin embargo, todavía no está resuelta desde el punto de vista instrumental, requiere de estudios sobre modos de inyección, válvulas de inyección, capilares de conexión, diseño de celdas de flujo de los detectores de cromatografía líquida convencional, conectores y columnas (de partículas o monolíticas, dimensiones, tamaños de partícula) entre otros para que pueda sustituir a la cromatografía convencional, sin pérdida de resolución y aprovechando su muy buena sensibilidad, debido a la menor dilución de la muestra. Mayoritariamente se ha desarrollado en el mundo de la proteómica, y generalmente acoplada a espectrometría de masas (Prüß et al., 2003; Prüß et al., 2006).

Para este trabajo se estudió la combinación de esta técnica con detección electroquímica (EC) para el análisis de compuestos fenólicos en muestras acuosas, este tipo de detectores ofrecen buena sensibilidad y selectividad para compuestos electroactivos.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Achilli G., Cellerino G.P., Melzi d'Eril G, Bird S., Simultaneous determination of 27 phenols and herbicides in water by high-performance liquid chromatography with multielectrode electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 697 (1995) 357-362.
- Amaral Mendes J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (2002) 781-788
- Anderson P. Pesticide Exposure Linked to Parkinson's, Alzheimer's Disease. *Medscape Medical News* 2009
- Anumantha A., Kanthasamy G., Kitazawa M., Kanthasamy A., Anantharam V. Dieldrin-Induced Neurotoxicity: Relevanceto Parkinson's Disease Pathogenesis. *NeuroToxicology* 26 (2005) 701–719
- Arambarri I., García R., Millán E., Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere* 51 (2003) 643-649
- ATSDR. Toxicological Profile for Polybrominated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBBs and PBDEs). September 2004
- Baird C. Química ambiental. Ed. Reverté, 2001
- Barker S.A., Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885 (2000) 115-127
- Basic principles of gas chromatography. *Journal of Chromatography Library*, Chapter1 Volume 10, 1977, Pages 1-31
- Beard J. DDT and human health. *Science of the Total Environment* 355 (2006) 78– 89
- Blanco J., Mulero M., López M., Domingo J. L., Sánchez D. J. BDE-99 deregulates BDNF, Bcl-2 and the mRNA expression of thyroid receptor isoforms in rat cerebellar granular neurons. *Toxicology* 290 (2011) 305–311
- Barreiro R., Quintela M., Ruiz J.M., TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Ecosistemas* 13 (2004) 13-29
- Baugros, J. B. Giroud, B. Dessalces, G. Grenier-Loustalot, M. F. Cren-Olive, C. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta* 607 (2008) 191-203
- Bosch Reig F., Campins Falcó P., Verdú Andrés J. H-Point standard additions method for resolution of overlapping Chromatographic peaks with diode array detection by using area measurements Determination of phenol and cresols in waters. *Journal of Chromatography A*, 726 (1996) 57-66.
- Brás I., Santos L. Alves A., Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gas chromatography-electron-capture detection alter solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 891 (2000) 305-311

- Bravo M., Lespes G., Gregori, I.D., Pinochet, H., Potin-Gautier, M., Identification of sulphur interferences during organotin determination in harbour sediment samples by sodium tetraethyl borate ethylation and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1046 (2004) 217-224
- Brown N. y Lamartinière C. Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. *Environmental Health Perspectives* 103 (1995) 708-713
- Bryan G. y Gibbs P. *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73 (1993) 913-929
- Carballo M., Aguayo S. Esperón F., Fernández A., de la Torre A., de la Peña E., Muñoz M.J. Exposición de cetáceos a contaminantes ambientales con actividad hormonal en el Atlántico. *Ecosistemas* 13 (2004) 39-44
- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*. 305 (1992) 609-61
- Cassi R., Tolosa I., Bartocci J., de Mora S. Organotin speciation analyses ion marine biota using sodium tetraethylborate ethylation and gas chromatography with flame photometric detection. *Applied organometallic chemistry* 2002 16 355-359
- Castillo M. y Barceló D. Analysis of industrial effluents to determine endocrine-disrupting Chemicals. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 10 (1997) 574-583
- Chafer Pericas C. (2006). Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Claver A., Ormad P., Rodríguez L, Ovelleiro J.L. Study of the presence of pesticides in surface Waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64 (2006) 1437-1443
- Denbesten C., Jurgen J.R.M. Vet*, Besselink H.T., Kiel G.S., van Berkel B.J.M., Beems R., van Bladeren P.J. The liver, kidney, and thyroid toxicity of chlorinated benzenes, *Toxicology and Applied Pharmacology*. Volume 111, Issue 1 (1991)69-81
- Denbesten C., Bennik M.H.J., Bruggeman I., Schielen P., Kuper F., Brouwer A., Koeman J.H., Vos J.G., Vanbladeren P.J. *Toxicology and Applied Pharmacology* 119(1993)181-194
- Everett C.J., Frithsen I.L., Diaz V.A., Koopman R.J., Simpson Jr W.M., Mainous A.G. Association of a polychlorinated dibenzo-p-dioxin, a polychlorinated biphenyl, and DDT with diabetes in the 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental Research* 103 (2007) 413-418.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere* 72 (2008) 1279-1285
- Gonçalves C. y Alpendurada M.F. Comparison of three different Poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticides multiresidues in water samples: structure and efficiency. *Journal of Chromatography A*, 963 (2002) 19-26

- Gonçalves C. y Alpendurada M.F. Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *Journal of Chromatography*, 1026 (2004) 239-250
- Górecki T., Yu X., Pawliszyn J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst* 124 (1999) 643-649
- Green T., Lee R., Farrar D., Hill J. Assessing the health risks following environmental exposure to hexachlorobutadiene *Toxicology Letters* 138 (2003) 63-73
- Haldin K., Holm L., Ridderstrale Y. y Brunström B. Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in ovo exposure to o,p-DDT. *Archives of Toxicology*, 77 (2003) 116-122
- Hallgren S., Darnerud P.O. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats—testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 177 (2002) 227-243
- Heberer Th., Schmidt-Bäumler K Stan H-J. Occurrence and distribution of Organic Contaminants in the Aquatic System in Berlin. PartI: Drug Residues and other Polar Contaminants in Berlin Surface and Groundwater. *Acta Hydrochimica and Hydrobiology* 26 (1998) 5 272-278
- Herráez-Hernández R., Campíns-Fálco P. Chiral separation of ephedrines by liquid chromatography using β -cyclodextrins. *Analytica Chimica Acta* 434 (2001) 315-324
- Irvine D.S. Male reproductive health: cause for concern? *Andrologia*, 32(2000)195-208
- Joffe M. Infertility and environmental pollutants. *British Medical Bulletin* 68 (2003) 47-70
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science Technology*, 32 (1998) 2498-2506
- Koh I-O., Thiemann W. 2001. Study of photochemical oxidation of standard chlorinated paraffins and identification of degradation products. *J. Photochem. Photobiol. A* 139: 205–215.
- Li Y.-F., Macdonald R.W., Jantunen L.M.M., Harner T., Bidleman T.F., Strachan W.M.J. The transport of β -hexachlorocyclohexane to the western Arctic Ocean: a contrast to α -HCH. *Science of the Total Environment* 291(2002)229-246
- Louch D., Motlagh S., Pawliszyn J. Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers. *Analytical Chemistry* 64 (1992) 1187-1199
- Luque-García J.L., Luque de Castro M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 1, 2003
- Meyer J., Liesener A., Gotz S., Hayen H., Karst U. Liquid Chromatography with On-Line Electrochemical Derivatization and Fluorescence Detection for the Determination of Phenols. *Analytical Chemistry* 75 (2003) 922-926.
- Mendes A. J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (2002) 781-788

- Mocarelli P. y Gerthoux P.M., Ferrari E., Patterson D.G., Kieszak S.M., Brambilla P., Vincoli N., Signorini S., Tramacere P., Carreri V., Sampson E.J., Turner W.E., Needham L.L. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *The Lancet* 355 (2000) 1858-1863
- Moeder M, Schrader S, Winkler M, Popp P. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A*, 873 (2000) 95-106
- Molina-Mayo C., Hernández-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodríguez-Delgado M.A. Determination of pesticides in wine using micellar electrokinetic chromatography with UV detection and sample stacking. *Journal of Chromatography A*, 1150 (2007) 348-355
- Moller H. Change in male: female ratio among newborn infants in Denmark. *The Lancet* 348 (1996) 828-829
- Öllers S., Singer H. Fässler P., Müller S.R. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A*, 911 (2001) 225-234
- Pan L., Adams M., Pawliszyn J. Determination of Fatty Acids Using Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* 67 (1995) 4396-4403
- Pavlikova N., Blahova L., Klan P., Bathula S.R., Sklenar V., Giesy J.P., Blaha L. Enantioselective effects of alpha-hexachlorocyclohexane (HCH) isomers on androgen receptor activity in vitro. *Chemosphere* 86 (2012) 65-69
- Peñalver A.M. (2002). Aplicación de la SPME al análisis medioambiental. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili.
- Pérez-Carrera E., León V.M. Gomez Parra A., Gonzalez-Mazo E. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1170 (2007) 82-90
- Peris E., Requena S., de la Guardia M., Pastor A., Carrasco J.M. Organochlorinated pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain). *Chemosphere* 60 (2005) 1542-1549.
- Prüß A., Kempter C., Gysler J., Jira T. Extracolumn band broadening in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1016 (2003) 129-141
- Prüß A., Kempter C., Gysler J., Jira T. Evaluation of packed capillary liquid chromatography columns and comparison with conventional-size columns. *Journal of Chromatography A* 1030 (2004) 167-176
- Raposo Junior J.L., Ré-Poppi N., Determination of organochlorine in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta* 72 (2002) 1833-1841
- Ratola N., Herbert P., Alves A. Uncertainty associated to the analysis of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction/gas chromatography-electron capture detection. Evaluation using two different approaches. *Analytica Chimica Acta* 573-574 (2006) 202-208

- Richardson, J.R., Caudle, W.M., Wang, M.Z., Dean, E.D., Pennell, K.D., and Miller, G.W. Developmental Exposure to the Pesticide Dieldrin Alters the Dopamine System and Increases Neurotoxicity in an Animal Model of Parkinson's Disease. *FASEB J.* 20(2006) 1695-1697
- Richardson J.R., Roy A., Shalat S.L., Buckley B., Winnik B., Gearing M., Levey A., Factor S.A., O'Suilleabhain P., German D.C. β -Hexachlorocyclohexane levels in serum and risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 32 (2011) 640-5
- Rivas A., Granada A., Jiménez M., Olea F., Olea N. Exposición humana a disruptores endocrinos. *Ecosistemas*, 13 (2004) 7-12
- Robert L. The Beginnings of Chromatography The Pioneers (1900-1960). *Journal of Chromatography Library*, CHAPTER 1, Volume 64, 2001, Pages 1-38 Wixom University of Missouri, Columbia, MO 65212, USA
- Sánchez-Prado L., García-Jares C., Llompert M. Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2390-2414
- Sarkar S.K., Bhattacharya B.D. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticide residues in tropical coastal environment of India: An overview. *Environmental International* 34 (2008) 1062-1071
- Silva M.H., Beauvais S.L., Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56 (2010) 4-17
- Smith N.W., Marlin N.D., Melin V. Liquid Chromatography.Packed Capillary. *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition), 2005, Pages 126-135
- Sonnenschein C. y Soto A.M. An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65 (1998) 143-150
- Sonnenschein C., Soto A.M, Disruptores endocrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. *Gaceta Sanitaria*, 2002 16(3) 201-211
- Srivastava A., T. Shivanandappa. Stereospecificity in the cytotoxic action of hexachlorocyclohexane isomers. *Chemico-Biological Interactions* 183 (2010) 34–39.
- Stevenson D.E., Walborg Jr E.F., North D.W., Sielken Jr R.L., C.E. Ross, Wright A.S., Xu Y., Kamendulis L.M., Klaunig J.E. Monograph: Reassessment of human cancer risk of aldrin: dieldrin. *Toxicology Letters* 109 (1999) 123–186
- Sumpter J.P. Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview. *Acta Hydrochimica Hydrobiologia*, 33 (2005) 1, 9-16
- Üvegues M., Abrankó L., Fodor P. Optimization of GC-ICPMS system parameters for the determination of butyltin compounds in Hungarian freshwater origin sediment and mussel samples. *Talanta* 73 (2007)490-497
- Vagi M.C., Petsas A.S., Kostopolou M.N., Karamanoli M.K., Lekkas T.D. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. *Desalination* 210 (2007) 146-156

Vanbeneden N., Delvaux F., Delvaux F.R..Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1136 (2006) 237-242.

Waring R.H., Harris R.M. Endocrine disrupters: A human risk?. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 244 (2005) 2-9

Wójtowicz A.K., Milewicz T., Gregoraszcuk E.L., DDT and its metabolite DDE alter steroid hormone secretion in human term placental explants by regulation of aromatase activity. *Toxicology letters* 173 (2007) 24-30

Wurl O., Obbard J.F., Chlorinated pesticides and PCBs in the sea-surface microlayer and seawater samples of Singapore. *Marine Pollution Bulletin*, 50 (2005) 1233-1243

Yang L., Luan T. y Lan C., Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determination of endocrine disrupting Chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1104 (2006) 23-32

Zhang Z., Pawliszyn J., Headspace Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* 65 (1993) 1843-1852

CAPÍTULO 2.

OBJETIVOS

Este trabajo de tesis es una contribución al estudio de la calidad de las aguas litorales de la Comunidad Valenciana siguiendo las directrices de la Directiva Marco del Agua (DMA). Para ello se han analizado, en las diferentes matrices recomendadas por la DMA y la Directiva 2008/105/CE (agua, sedimento y biota), las sustancias establecidas en estas directivas como sustancias prioritarias y otros contaminantes. Debido a la complejidad de las muestras ambientales y a que estas sustancias se encuentran a niveles de trazas, es necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos, que permitan la determinación de estas sustancias a las concentraciones en que se encuentran en el medio.

El objetivo principal de este trabajo es determinar la calidad de las aguas costeras y de transición de la Comunidad Valenciana en base a las exigencias fijadas por la DMA en cuanto a la presencia de contaminantes orgánicos prioritarios. Para ello, se plantean una serie de objetivos específicos:

- Desarrollar métodos analíticos para el análisis de algunas sustancias prioritarias como polibromo-difenil-éteres y compuestos organoclorados, cloroalcanos de cadena corta (C10-13) compuestos de estaño y alquilfenoles. Las sustancias prioritarias se pueden clasificar en diferentes familias en función de su estructura química. Cada una de estas familias debido a las propiedades químicas y físicas que poseen debe ser tratada de forma diferente, por lo que es necesario estudiar diferentes metodologías para su extracción de la matriz y su posterior análisis. Se deben estudiar diferentes técnicas de extracción y separación de modo que se pueda establecer la metodología óptima de coste efectivo para su análisis.

- Analizar la presencia de sustancias prioritarias en las aguas litorales de la Comunidad Valenciana, así como su comportamiento en el medio acuático. Para ello, se estudiarán diferentes matrices: las muestras acuosas, que permitirán determinar la presencia de estas sustancias en el medio acuático; los sedimentos, que permiten observar la posible acumulación de estas sustancias, así como su persistencia en este medio; y, finalmente, la biota, para determinar la acumulación de éstas en los tejidos adiposos de los organismos acuáticos. Para este último estudio se deben seleccionar organismos que sean representativos de la zona, en este caso mejillones y tellinas.

- Estudiar la distribución espacial y temporal de las distintas sustancias prioritarias consideradas, analizando su posible origen. Para poder llevar a cabo este objetivo será necesario realizar diferentes muestreos estacionales y anuales, como establece la DMA.

Las tareas que se han desarrollado para conseguir los objetivos definidos se describen a continuación:

- Estudio bibliográfico de la presencia de los contaminantes mencionados en las matrices agua, sedimento y biota.

- Desarrollo y validación de procedimientos analíticos de coste efectivo para los diferentes analitos y matrices.

- Realización de campañas de muestreo y análisis de las sustancias prioritarias en las muestras recogidas para cada matriz.

- Establecimiento de conclusiones a partir de los datos obtenidos en cuanto a la presencia de los contaminantes estudiados en el medio marino y zonas de transición de la Comunidad Valenciana.

CAPÍTULO 3.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS

Los reactivos empleados para la optimización de los métodos fueron de grado analítico. Los compuestos empleados para obtener las disoluciones patrón fueron tributilo de estaño de pureza 96% (TBT, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), difenilo de estaño de 96% (DPHT), trifenilo de estaño de 97% de pureza (TPHT) y trietilo de estaño de 97% de pureza (TET). diclorometano (DCM, solución metanólica 5000ng/ml), endosulfán de 98% pureza (EndS, $\alpha+\beta=2+1$), mezcla isómeros hexaclorociclohexano (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH) de 98.9% de pureza, alacloro de 99.8% pureza, aldrín de 98.1% pureza, dieldrín de 97.9% de pureza, endrín de 99.1% pureza, isodrín de 94.4% pureza, 1,2,3-triclorobenceno (TCBI) de 99% pureza, 1,2,4-triclorobenceno (TCBII) de 99.5% de pureza, 1,3,5-triclorobenceno (TCBIII) de 99% de pureza, hexacloro-1,3-butadieno (HCBD) de 98.35 de pureza, pentaclorofenol de 98% de pureza (PCP), hexaclorobenceno (HCB) de 99% de pureza, DDT de 98% de pureza, pentabromo-difenil-éter en isooctano (BDE-99), cloroalcanos de cadena corta (SCCP, C₁₀-C₁₃ 63% Cl) todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Bromo-difenil-éter técnico de 99% de pureza (BDE) y cloroalcanos de cadena corta solución de 100µg/L en ciclohexano (SCCP, C₁₀-C₁₃ 63% Cl) fueron adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) fenol, o-cresol, 2-clorofenol y bisfenol A (MERCK, Schurcharadt, Alemania). El agua empleada en los análisis fue agua ultrapura, obtenida de un sistema Nanopure II (Sybron, Barnstead). Los patrones madre eran preparados en metanol en concentraciones del orden de mg/L y conservados en nevera hasta su uso.

Como reactivo derivatizante se empleó tetraetilborato de sodio (STEB), adquirido de Waseser-Lab (Alemania). Este producto debido a su reactividad era conservado en un desecador, a su vez situado dentro de una bolsa en atmósfera inerte de nitrógeno, todo ello ubicado dentro de una campana extractora. El patrón empleado en la derivatización era un patrón acuoso al 2% preparado diariamente y guardado en la nevera a 5°C. El análisis se llevaba a cabo en medio ácido a pH aproximadamente 5, ya que es el pH más favorable para el proceso de derivatización (Chi-Chi Chou et al., 2005). La disolución tampón se preparaba con ácido acético del 98% y acetato de sodio ambos reactivos se adquirieron de WVR (Steinheim, Alemania). Para las pruebas de salinidad se utilizó cloruro sódico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Como retenedores de lípidos y dispersantes fueron utilizados C₁₈ (60µm), Florisil® (60-100 µm) y sílica gel adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

Los reactivos empleados para la fase móvil fueron acetonitrilo (J.T Baker, Deventer, Holanda), agua ultrapura obtenida con un sistema Nanopure II (Sybron, Barnstead) y cloruro potásico (MERCK, Darmstadt, Alemania). Distintas fases móviles fueron empleadas para los procedimientos desarrollados: una mezcla acetonitrilo-cloruro potásico 2mM en agua (35:65) y una mezcla acetonitrilo-cloruro potásico 2mM en agua (30:70). Todas las fases móviles fueron

filtradas diariamente con membranas de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro (Teknokroma, Barcelona, Spain) y desgasificada con un desgasificador de vacío on-line (Agilent 1100 Series).

3.2 MATERIALES

- Dispositivo para SPME (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Fibras de poliacrilato (blanca) de 85 μm , fase parcialmente entrecruzada (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Fibras de polidimetilsiloxano (roja) de 100 μm , fase no enlazada (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Fibras de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (rosa) de 65 μm , fase parcialmente entrecruzada (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Cartuchos para SPE de polipropileno de 3 mL con fritas de polietileno de 20 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Membranas de nylon (diámetro 47mm), tamaño de poro 0.45 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Sistema de filtración a vacío de fases móviles de cromatografía de líquidos (Supelco).
- Mortero cerámico.
- Agitadores y barras agitadoras magnéticas.

3.3 INSTRUMENTACIÓN

3.3.1 EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA GASEOSA

3.3.1.1 Cromatógrafo de gases con detectores μECD y FID

Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N, Palo Alto, CA, USA) acoplado a dos detectores: un detector de captura de electrones (μECD), y un detector de ionización de llama (FID). Equipado con dos puertos de inyección split/splitless, el liner utilizado en el inyector era un liner split-splitless desactivado, con lana de vidrio, de Agilent Technologies. Equipado con dos columnas capilares HP-5MS de 30 m de longitud y 0.250 mm de diámetro interno, también de Agilent Technologies, de fase estacionaria de 0.25 μm de grosor y composición: 95% de polidimetilsiloxano y 5% de fenilarileno. Los gases empleados para encender la llama del detector FID fueron hidrógeno y aire sintético; el gas utilizado en el detector de captura de electrones era nitrógeno de elevada pureza. Helio era utilizado como gas portador para ambos detectores (Figura 27).



Figura 27. Cromatógrafo de gases 6890N con ECD y FID, y cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas, de Agilent Technologies.

3.3.1.2 Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas

Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert). Consta de un puerto de inyección split/splitless, con una columna capilar HP-5MS de 30 m de longitud y 0.250 mm de diámetro interno, también de Agilent Technologies, cuya fase estacionaria era de 0.25 μm de grosor con una composición de 95% de polidimetilsiloxano y 5% de fenilarileno. El gas portador utilizado era helio.

La temperatura de la línea de transferencia entre el cromatógrafo y el detector se mantuvo a 280°C, mientras que la fuente de iones se mantuvo a 250°C. El modo de trabajo del espectrómetro fue el de ión selectivo (SIM), y la energía de impacto de los electrones se estableció en 69.9 eV. (Figura 27)

3.3.2 EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

Sistema de cromatografía líquida capilar, constituido por una bomba capilar (Agilent Series 1000, Waldbron, Germany) equipada con una válvula de inyección (Rheodyne modelo 7725) con un loop interno de 2 μL . Detector integrado de reducción y oxidación (INTRO), que trabaja en modo DC (corriente continua) con una potencia máxima de 150 W y una frecuencia de 50/60 Hz. El potencial de la celda puede ser variado ente -1.5 y +1.5 V mediante un mando situado en frontal del equipo, el rango (R) que permite seleccionar el intervalo de señal de trabajo entre 0.01-10 y el Filtro (F), para mejorar el ruido de fondo, entre 0.1 y 5.

Para la reducción y oxidación de los compuestos este detector lleva incorporada una celda electroquímica VT-03 (Figura 28) con electrodo de trabajo de carbón vitrificado cuyo diámetro es 0.7 mm. El electrodo de referencia es un ISAAC que se encuentra en contacto directo con la fase móvil con iones cloruro, y será la concentración de iones cloruro lo que

determine el potencial (el potencial ISAAC en disolución KCl 2mM es 189 mV). La columna utilizada es Zorbax SB C₁₈ (150 x 0.5 mm i.d., 5µm diámetro de partícula) de Agilent.



Figura 28. Detector electroquímico (INTRO), celda electroquímica (VT-03/ISAAC) y montaje



Figura 29. Sistema de cromatografía líquida capilar

3.4 OTROS EQUIPOS

- Horno microondas Ethos 1 (Milestone). Equipado con 10 recipientes individuales de teflón de 100 mL.
- Baño ultrasonidos, Selecta P. Ultrasound-H System (España)
- Centrifuga Eppendorf 5804
- Balanza analítica digital mettler Toledo XP105
- Liofilizador ilShin FD5510
- Molino de bolas Retsch MM301
- pH-metro (WTW pH electrode sensor)

3.5 DISTRIBUCIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO

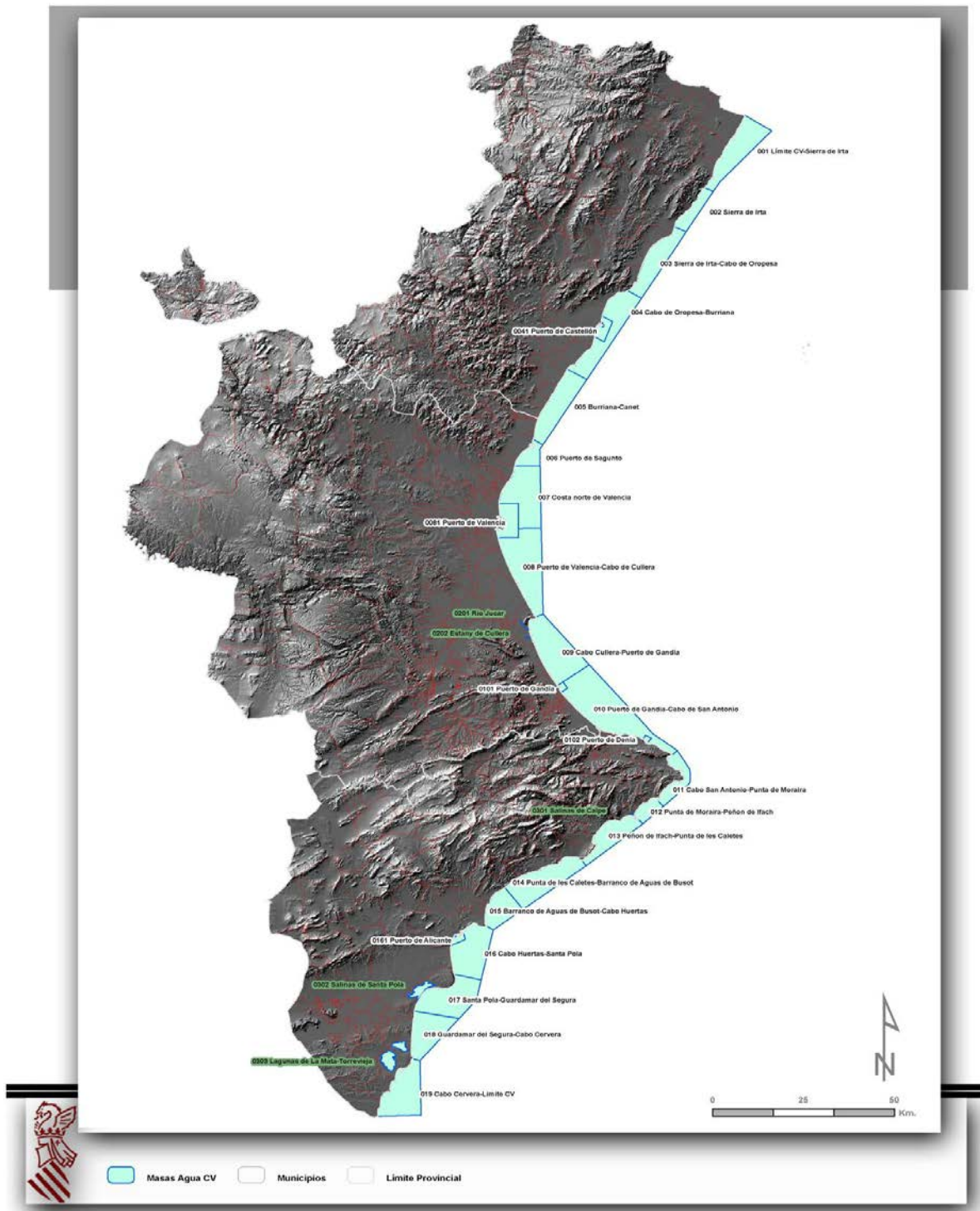


Figura 30. Delimitación de las masas de agua superficial de la Comunidad Valenciana.

Como dicta la Directiva Marco del Agua, todos los miembros de la Comunidad Europea deben velar por el buen estado químico de las aguas. Esto es, que las aguas superficiales de la Comunidad cumplan los objetivos medioambientales y la presencia de contaminantes en estas no superen las normas de calidad ambiental establecidas. Para un completo estudio del estado químico de las aguas superficiales de la costa de la Comunidad Valenciana, ésta fue dividida en diferentes masas de agua como se aclara en la Figura 30. Entre estas masas de agua se delimitaron:

- *24 masas de aguas costeras*, que son aquellas situadas desde la costa hasta una distancia de una milla náutica mar adentro. Entre ellas, 6 áreas son masas de agua muy modificadas por la presencia de puertos próximos: puerto de Castellón, puerto de Sagunto, puerto de Valencia, puerto de Denia, puerto de Gandía y puerto de Alicante.
- 3 zonas de transición, que se definen como masas de agua superficial parcialmente salinas como consecuencia de su proximidad a las aguas costeras, pero que reciben una notable influencia de flujos de agua dulce.

Dentro de las masas de agua establecidas se fijaron diferentes puntos de muestreo, de los cuales se tomaron y analizaron muestras acuosas para determinar el estado químico de dichas masas. Además del análisis de las aguas, otros indicadores y bioindicadores de la contaminación ambiental fueron estudiados en este trabajo, como son los sedimentos y la biota (bivalvos). Simultáneamente, vertidos de depuradora con efluente al mar fueron estudiados para conocer las presiones de los contaminantes.

3.5.1 PUNTOS DE MUESTREO DE ZONAS DE TRANSICIÓN

En este trabajo se estudiaron tres de las zonas más importantes de transición de la Comunidad Valenciana: Salinas de Santa Pola, desembocadura del río Júcar y Estany de Cullera. Como se señala en la Figura 31 dentro de cada zona de transición se fijaron diferentes puntos de muestreo: 1 para el Estany de Cullera, 2 para el río Júcar y 6 para las Salinas de Santa Pola. En la Tabla 4 se indican, para cada punto concreto de muestreo, el código, el huso, las coordenadas UTM y la zona a la que pertenecen.

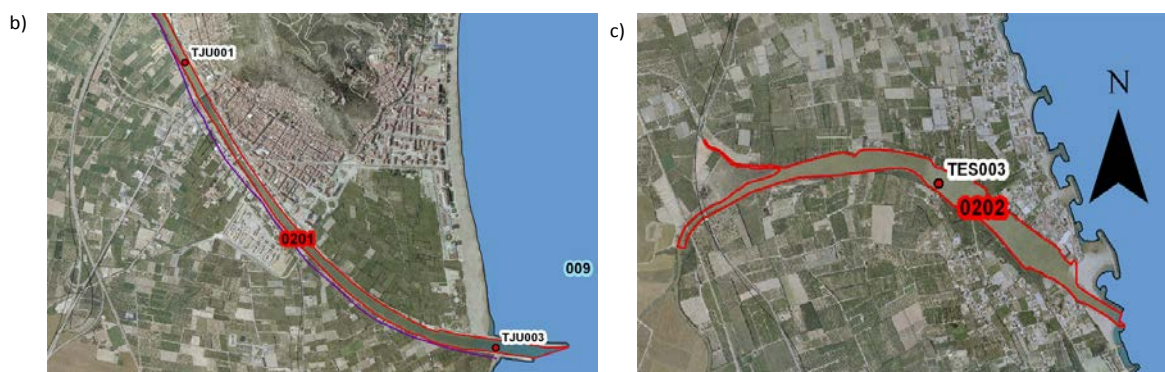


Figura 31. Zonas de transición muestreadas. a) Salinas de Santa Pola. b) río Júcar. c) Estany de Cullera

Tabla 4. Puntos de muestreo de aguas de transición.

Código	Huso	XUTM	YUTM	Zona	Población
TJU001	30N	736772	4339202	0201	Río Júcar
TJU003	30N	738731	4337408	0201	Río Júcar
TES003	30N	738694	4335076	0202	Estany Cullera
SPC001	30N	705678	4227681	0302	Salina Santa Pola
SPC003	30N	707185	4228727	0302	Salina Santa Pola
SPC004	30N	707170	4228786	0302	Salina Santa Pola
SPC006A	30N	706864	4229767	0302	Salina Santa Pola
SPC007A	30N	707484	4230302	0302	Salina Santa Pola
SCP008	30N	708407	4230623	0302	Salina Santa Pola

3.5.2 PUNTOS DE MUESTREO DE AGUAS COSTERAS

Dentro de las 24 masas de agua costeras de la C. Valenciana establecidas, 41 puntos de muestreo fueron fijados en las distintas zonas. En la Tabla 5 se indica el código de cada punto de muestreo, así como el huso, las coordenadas UTM, y la zona y población a la que pertenecen.

Tabla 5. *Puntos de muestreo de aguas costera*

Código	Huso	XUTM	Y UTM	Zona	Población
DP007	30N	790326	4478252	001	Playa de La Caracola
DP003	30N	795708	4487347	001	Cala al sur Playa Las Cañas
DP136	30N	782935	4464203	002	Cala Argilaga, Sierra de Irta
DP016	30N	768461	4443214	003	Playa Les Amplaries
DP027	30N	755346	4421826	004	Playa al sur del delta del río Mijares
DP022	30N	758859	4432458	004	Playa del Serradal, Castellón
DP025	30N	756651	4425838	0041	Playa del Ben Afeli, Almassora, Castellón
DP159	30N	756587	4426428	0041	Sur Puerto Castellón
DP032	30N	747676	4413061	005	Playa de Nules
DP036	30N	742359	4403557	005	Playa de Casablanca, Almenara
DP042	30N	737318	4391323	006	Playa sur Puerto de Sagunto
DP043	30N	736417	4390384	006	Playa Marjal del Moro, Sagunto
DP047R	30N	730286	4376222	007	Playa al norte del Barranco del Carraixet
DP151	30N	734157	4384505	007	Playa del Bam de Pescadors, El Puig
DP046	30N	733219	4382450	007	Playa de de Farnals
DP055	30N	739979	4341684	008	Playa el Dosel
DPU001	30N	730316	4363855	008	Playa del Saler
DP049	30N	729678	4367055	0081	Playa de Pinedo, sur Puerto Valencia
DP163	30N	729880	4365574	0081	Playa L'Arbre del Gos, Pinedo
DP161	30N	730354	4374059	0081	Playa de , Valencia
DP048	30N	730568	4371896	0081	Playa del Cabañal, norte Puerto Valencia
DP061	30N	742562	4326926	009	Playa de Xeraco
DP057	30N	738528	4338712	009	Playa , Cullera
DP073	30N	771436	4303097	010	Playa de La Marineta
DP167	30N	746817	4319892	0101	Playa Espigón sur Puerto Gandia
DP064	30N	746908	4319603	0101	Playa Del Manrey de Rafalcaid, Sur Puerto Gandia
DP173	30N	770958	4303460	0102	Playa de Marineta, Casiana
DP080	30N	778003	4291824	011	Playa de La Granadella
DP085	30N	730286	4283639	012	Cala Les Basetes, Benissa
DP092	30N	759479	4279363	013	Playa al sur del club náutico mar y montaña
DP102	30N	733915	4261674	014	Sur de , El Campello
DP104	30N	727077	4254974	015	Playa Muchavista, El Campello
DP175	30N	728545	4257371	015	Playa Almadrava, EL Campello
DP113	30N	717031	4240374	016	Playa del Saladar,
DP114	30N	717675	4235289	016	Playa Carabassi,
DP109	30N	717811	4245288	0161	Playa al sur del Puerto Alicante
DP111	30N	717291	4243626	0161	Playa Agua Amarga,
DP115	30N	715910	4229836	017	Playa del Varador, Santa Pola
DP117	30N	710902	4229690	017	Playa Mollet de Les Salines, Santa Pola
DP122	30N	706206	4212336	018	Playa de Ortigues-Campo, Guardamar del Segura
DP185	30N	706434	4216935	018	Playa del Moncayo
DP131	30N	696947	4193248	019	Playa del Sacaniat, Pilar de la Horada

3.5.3 PUNTOS DE MUESTREO DE BIOTA

Como bioindicadores de la contaminación marina tomaron muestras de bivalvos, concretamente: mejillones (*Mytilus Galloprovincialis*) y tellinas (*Donax Trunculus*) de las 24 masas de agua establecidas. Estas especies al ser relativamente sedentarias resultan útiles para determinar la contaminación en un área concreta, ya que parte de los contaminantes presentes en el agua son filtrados y acumulados en tejidos. Además, ya que estos organismos filtran la columna de agua donde crecen, se tomaron muestras de estas aguas, a 10 cm de profundidad y tras la línea de rompientes de las olas, para cada punto de muestreo. En la Tabla 6 y Tabla 7 se indican, para cada organismo y cada punto concreto de muestreo, el código, el huso, las coordenadas UTM y la zona a la que pertenecen.

Tabla 6. *Puntos de muestreo de tellinas*

Bivalvo	Código	XUTM	YUTM	Zona	Población
Tellina	T026	789142	4474113	001	Playa del norte, Peñíscola
Tellina	T025	791666	4479950	001	Playa Marxica, Benicarló
Tellina	T024	794996	4485920	001	Playa el Forti, Vinaroz
Tellina	T027	758618	4429894	0041	Playa el Pinar, Castellón
Tellina	T028	740722	4399721	005	Playa Corinto, Sagunto
Tellina	T002	736643	4390503	006	Marjal del Moro
Tellina	T003	734700	4386871	006	Playa del Puig
Tellina	T001	739469	4394055	006	Playa del Puerto de Sagunto
Tellina	T004	7733022	4382201	007	Playa sur del Puerto de la Pobla de Farnals
Tellina	T005	730294	4375948	007	Playa de Alboraya
Tellina	T011	736995	4347999	008	Playa del Manreny de Barraquetes
Tellina	T008	732571	4357183	008	Playa de la Devesa
Tellina	T009	734376	4353499	008	Playa del Perellonet
Tellina	T010	735820	4350667	008	Playa del Perello
Tellina	T007	729789	4367262	0081	Playa de Pinedo
Tellina	T006	730682	4326585	0081	Playa del Cabañal
Tellina	T015	742769	4334455	009	Playa de Xeraco
Tellina	T012	739755	4340943	009	Playa Cap Blanc, Cullera
Tellina	T014	739749	4324169	009	Playa del Brosquil, Cullera
Tellina	T016	744119	4337044	009	Playa del Sur del Rio Vaca
Tellina	T013	738884	4312462	009	Playa Marenyet, Cullera
Tellina	T018	753137	4310033	010	Playa Agua Blanca, Oliva
Tellina	T019	755393	4319177	010	Playa Agua Muerta, Oliva
Tellina	T017	747146	4225797	0101	Playa del Mareny de Rafalcaid, Gandía
Tellina	T020	708081	4225797	017	Playa de la Marina, Elche
Tellina	T021	706345	4212552	019	Playa de Ortigues-Campo
Tellina	T022	697921	4197144	019	Playa Campoamor, Orihuela
Tellina	T023	697057	4193465	019	Playa del Conde, Torre de la Horada

Tabla 7. *Puntos de muestreo de mejillón*

Bivalvo	Código	XUTM	YUTM	Zona	Población
Mejillón	Z016	795312	4486152	001	Espigón playa el forti, Vinaroz
Mejillón	Z017	791642	4479081	001	Espigón sur puerto deportivo Benicarló
Mejillón	Z018	789495	4473534	001	Lado norte del castillo, Peñíscola
Mejillón	Z019	779856	4461182	002	Espigón norte playa les fonts, Alcassebre
Mejillón	Z021	774422	4454199	003	Playa de Torrenostra
Mejillón	Z020	768051	4442263	003	Playa Morro de Gos, Oropesa
Mejillón	Z004	756693	4425650	004	Playa de la Torre, Almassora
Mejillón	Z005	751684	4417522	004	Espigón playa la Malvarrosa, Almassora
Mejillón	Z003	756665	4425649	0041	Sur refinería, Playa de Almassora
Mejillón	Z001	757172	4426919	0041	Sur del puerto comercial, Castellón
Mejillón	Z002	756477	4425982	0041	Escollera frente a refinería
Mejillón	Z027	758887	4429141	0041	Espigón norte puerto de Castellón
Mejillón	Z007	742394	4403554	005	Espigón Aceauia de Almenara
Mejillón	Z006	747833	4413181	005	Espigón playa de Nules
Mejillón	Z030	736863	4390837	006	Marjal del Moro
Mejillón	Z008	739824	4393122	006	Espigón norte del puerto de Sagunto
Mejillón	Z028	736757	4390710	006	Marjal del Moro
Mejillón	Z026	733855	4383249	007	Espigón playa Medicalia, Pobl de Farnals
Mejillón	Z015	730490	4376407	007	Espigón playa Alboraya
Mejillón	Z100	740452	4341420	008	Faro de Cullera
Mejillón	Z013	735351	4351410	008	Espigón sur, puerto deportivo Perelló
Mejillón	Z014	729946	4367261	0081	Espigón sur, desembocadura rio Turia
Mejillón	Z011	739535	4334459	009	Espigón sur, desembocadura Estany de Cullera
Mejillón	Z012	738959	4337326	009	Espigón sur, desembocadura rio Júcar
Mejillón	Z009	752209	4313248	010	Escollera playa Agua Blanca, Oliva
Mejillón	Z010	749605	4319720	0101	Espigón sur, desembocadura rio Serpis Gandía
Mejillón	Z025	770239	4304798	0102	Escollera norte puerto deportivo Denia
Mejillón	Z047	775428	4289439	011	Cala Moraig
Mejillón	Z046	780348	4294589	011	Playa La Barraca
Mejillón	Z050	768518	4283610	012	Calas Las Bassetes
Mejillón	Z049	771919	4286629	012	Sur puerto deportivo Moraira
Mejillón	Z053	759702	4279419	013	Norte puerto deportivo
Mejillón	Z055	756717	4275759	013	Escollera norte puerto deportivo Altea
Mejillón	Z058	733874	4261631	014	Cala Lanuza
Mejillón	Z057	742999	4266082	014	Escollera norte puerto Villajoyosa
Mejillón	Z059	728343	4256920	015	Sur puerto deportivo Campello
Mejillón	Z060	726902	4248292	016	Cabo Huerta
Mejillón	Z022	717214	4242943	0161	Cala Los Borrachos
Mejillón	Z023	714087	4229776	017	Escollera norte puerto Santa Pola
Mejillón	Z024	706739	4220679	018	Escollera sur desembocadura rio Segura

3.5.4 PUNTOS DE MUESTREO DE SEDIMENTO

La contaminación marina también fue estudiada a través del sedimento de las masas de agua de la Comunidad Valenciana, se tomó una muestra de cada masa. Asimismo, se tomaron muestras de la columna de agua a 10 cm de profundidad y tras la línea de rompientes de las olas. En la Tabla 8 se indica el código de cada punto concreto de muestreo, el huso, las coordenadas UTM y la zona a la que pertenecen. Este análisis se llevó a cabo en muestras costeras y muestras de transición.

Tabla 8. *Puntos de muestreo de sedimentos.*

Código	X UTM	Y UTM	Zona	Población
Z001	278145	4468464	001	Límite de la CV - Sierra de Irta
Z004	271909	4460301	002	Sierra de Irta
Z005	257919	4443307	003	Sierra de Irta - Cabo de Oropesa
Z007	248662	4435533	004	Cabo de Oropesa - Burriana
Z030	244504	4425970	0041	Puerto de Castellón
Z008	741418	4398815	005	Burriana - Canet d'en Berenger
Z031	738310	4390490	006	Puerto de Sagunto
Z032	732895	4379294	007	Costa norte de Valencia
Z009	735887	4351299	008	Puerto de Valencia - Cabo de Cullera
Z010	730859	4365302	0081	Puerto de Valencia
Z011	740661	4332808	009	Cabo de Cullera - Puerto de Gandía
Z000	243888	4306074	010	Puerto de Gandía - Cabo de San Antonio
Z013	747212	4319734	0101	Puerto de Denia
Z015	250485	4303070	0102	Puerto de Gandía
Z016	256407	4295717	011	Cabo de San Antonio – Punta de Moraira
Z017	249363	4284757	012	Punta de Moraira – Peñón de Ifach
Z033	757645	4276431	013	Peñón de Ifach – Punta de les Caletes
Z018	741224	4264804	014	Punta de les Caletes – Barranco de Aguas de Busot
Z020	728375	4256285	015	Barranco de Aguas de Busot – Cabo de Huertas
Z021	717550	4238916	016	Cabo de Huertas – Santa Pola
Z022	719756	4245322	0161	Puerto de Alicante
Z034	714582	4228777	017	Santa Pola - Guardamar del Segura
Z035	707399	4219935	018	Guardamar de Segura – Cabo de Cervera
Z028	704365	4204996	019	Cabo de Cervera – Límite de la CV
TJU003	738731	4337408	0201	Estuario del río Júcar
TES003	738694	4335076	0202	Estany de Cullera
SPC001	705678	4227681	0302	Salinas de Santa Pola
SPC008	708407	4230623	0302	Salinas de Santa Pola

3.5.5 PUNTOS DE MUESTREO DE VERTIDOS DE DEPURADORA

Para este estudio también se analizaron muestras de efluentes de 28 depuradoras de la Comunidad Valenciana que realizan su vertido al mar. En la Tabla 9 se indican los códigos de cada una de las depuradoras muestreadas, así como el huso, las coordenadas UTM de cada una de ellas, la zona donde se realiza el vertido y las poblaciones desde las que se realiza el vertido.

Tabla 9. *Puntos de muestreo de efluentes de depuradora*

Código	Huso	X	Y	Zona	Población
DEP001	30N	795378	4486629	001	Vinaroz
DEP002	30N	791616	4480034	001	Benicarlò
DEP003	30N	788864	4473339	001	Peñíscola
DEP004	30N	780398	4461886	002	Alcossebre
DEP005	30N	773049	4455203	003	Torreblanca
DEP006	30N	768304	4444634	003	Oropesa
DEP007	30N	759455	4436847	004	Benicassim
DEP030	30N	755853	4430741	0041	BP Castellón
DEP008	30N	755853	4430740	0041	Castellón
DEP031	30N	755754	4426886	0041	UBE (PROQUIMED)
DEP032	30N	749431	4416393	004	Burriana
DEP009	30N	740005	4396852	005	Canet de Berenguer
DEP010	30N	731795	4383139	007	L'Horta Nord
DEP011	30N	730130	4374130	0081	Vera
DEP000	30N	728797	4368129	0081	Pinedo General
DEP013	30N	729241	4367378	0081	Pedanía Pinedo
DEP015	30N	737225	4337400	0201	Cullera
DEP016	30N	745847	4318602	0101	Gandia
DEP017	30N	751860	4313065	010	Oliva
DEP033	30N	756087	4307717	010	Refrescos Iberia (Interfruit)
DEP018	30N	763757	4301581	010	Denia
DEP020	30N	775114	4296520	011	Javea Arenal
DEP021	30N	772216	4287137	012	Moraira
DEP022	30N	765948	4283916	013	Calpe
DEP034	30N	754715	4271019	013	Benidorm
DEP035	30N	727720	4255570	014	Bonyntza
DEP028	30N	721633	4251710	016	Monte Orgegia

3.6 CAMPAÑAS DE MUESTREO

Las campañas de muestreo se establecieron según lo dispuesto en el artículo 5 de la DMA. Es decir, se realizaría un reconocimiento inicial (control de vigilancia) y un programa de seguimiento ordinario (control operativo) en las distintas masas de agua definidas en la Comunidad Valenciana.

- El control de vigilancia, según establece la DMA en su anexo V, se debe realizar en cada punto de control (masa de agua) durante un período de un año dentro del período que abarque el plan hidrológico de cuenca establecido y se debe efectuar, entre otros parámetros, sobre la lista de contaminantes prioritarios y otros contaminantes que se descarguen en la cuenca o subcuenca.
- El control operativo, según establece la DMA en su anexo V, se debe aplicar sobre aquellas masas de agua que se considere, bien basándose en los resultados de la evaluación del impacto llevada a cabo según lo dispuesto en el artículo 5 de la DMA o

bien basándose en el control de vigilancia, que puedan no cumplir sus objetivos medioambientales y sobre las masas de agua que reciban vertidos de sustancias incluidas en la lista de sustancias prioritarias.

Para ambos controles, la DMA recomienda para el análisis de las sustancias prioritarias una periodicidad mensual, salvo en el caso de que se justifiquen intervalos mayores en función de los conocimientos técnicos y la apreciación de los especialistas. En caso de reducir la periodicidad de análisis se recomienda que las fechas elegidas para efectuar el seguimiento sean tales que se reduzca al máximo el impacto de variación estacional.

- **Control de vigilancia**

En este trabajo, el período de control de vigilancia se llevó a cabo entre 2008 y 2009. Se realizaron un total de cuatro campañas de muestreo para muestras acuosas dentro de un período anual como establece la DMA: julio- noviembre 2008 y febrero-mayo 2009. Por otro lado, se realizó una campaña de muestreo de muestras de biota en julio de 2008, y dos campañas en 2006 y 2007, previas a este trabajo de tesis. En cuanto a sedimento, se realizaron tres campañas en 2010, 2011 y 2012.

- **Control operativo**

Para el control operativo, se realizaron diferentes campañas de muestreo en 2010, 2011 y 2012. Para muestras acuosas cuatro campañas en cada año, y además una campaña de muestreo de biota en julio de 2010. La Tabla 10 explica las campañas de muestreo realizada para cada matriz.

Tabla 10. *Campañas de muestreo*

		Aguas	Biota		Sedimento
	2006 ^a	-	Julio		-
Control de vigilancia	2007 ^a	-	Julio		-
	2008	Julio / Noviembre	Julio		-
	2009	Febrero / Mayo	-		-
	2010	Febrero Mayo/ Julio/Noviembre	Julio		Julio
Control operativo	2011	Febrero Mayo/ Julio/Noviembre	-	Control de vigilancia	Julio
	2012	Febrero/Julio	-		Julio

a. Datos previos a este trabajo de tesis

- **Toma de muestra**

Las muestras de agua se tomaron en la columna de agua a 10 cm de profundidad y tras la línea de rompientes de las olas, con el fin de evitar extraer la muestra en zonas de resuspensión del sedimento. En campañas con una baja agitación por efecto del olaje, en las cuales no se distingue la línea de rompientes, se tomaba la muestra cuando la playa alcanzaba una profundidad de 1 metro aproximadamente.

Los mejillones se recogieron a mano de zonas rocosas y escolleras, con ayuda de una espátula. Las tellinas se recogieron de las zonas de playa mediante un rastrillo cribador.

Las muestras de sedimento se recogieron en corers metálicos de aproximadamente 20 mL de volumen útil, a una profundidad entre 7 y 10 m.

3.7 SUSTANCIAS A ANALIZAR EN LAS DISTINTAS MATRICES

Como ya se ha comentado en el punto 1.3 no todas las sustancias descritas tienen la misma capacidad para bioacumularse o adherirse a la materia particulada. Debido a las propiedades de algunas de las sustancias, la Directiva 2008/105/CE recomienda, además del estudio de todas ellas en aguas, el estudio de determinados contaminantes en biota y sedimento.

Como se ha comentado en el punto 1.2, para la determinación de la calidad de las masas de agua la Directiva 2008/105/CE establece dos tipos de normas de calidad: la norma de calidad ambiental expresada como concentración máxima admisible (NCA-CMA) para la protección contra la exposición a corto plazo y la norma de calidad ambiental expresada como concentración media anual (NCA-MA) a un nivel que proporcione protección contra la exposición a largo plazo (Anexo I).

A continuación se indican las sustancias que se analizan en cada una de las diferentes matrices (Tabla 11). Para el análisis de muestras de biota y sedimento, también se estudió el análisis de la columna de agua existente sobre la muestra.

Tabla 11. *Compuestos analizados en las diferentes matrices.*

SUSTANCIA	AGUAS		BIOTA		SEDIMENTO	
	costas	transición	fase acuosa	bivalvo	fase acuosa	sedimento
Alacloro	X	X				
Antraceno	X	X	X	X	X	X
Atrazina	X	X				
Benceno	X	X				
Difeniléteres bromados	X	X	X	X	X	X
Tetracloruro de carbono	X	X				
Cloroalcanos C10-13	X	X	X	X	X	X
Clorfenvinfós	X	X				
Clorpirifós	X	X				
Aldrín	X	X				
Dieldrín	X	X				
Endrín	X	X				
Isodrín	X	X				
DDT	X	X				
1,2-Dicloroetano	X	X				
Diclorometano	X	X				
Dietilhexilftalato	X	X	X	X	X	X
Diuron	X	X				
Endosulfan	X	X				
Fluoranteno	X	X	X	X	X	X
Hexaclorobenceno	X	X	X	X	X	X
Hexaclorobutadieno	X	X	X	X	X	X
Hexaclorociclohexano	X	X	X	X	X	X
Isoproturon	X	X				
Naftaleno	X	X				
4-nonilfenol	X	X	X	X	X	X
t-nonilfenol	X	X	X	X	X	X
Octilfenol	X	X	X	X	X	X
Pentaclorobenceno	X	X	X	X	X	X
Pentaclorofenol	X	X				
Benzo(a)pireno	X	X	X	X	X	X
Benzo(b)fluoranteno	X	X	X	X	X	X
Benzo(k)fluoranteno	X	X	X	X	X	X
Indenopireno+Benzo(ghi)perileno	X	X	X	X	X	X
Simazina	X	X				
Tetracloroetileno	X	X				
Tricloroetileno	X	X				
Tributilo de estaño	X	X	X	X	X	X
1,2,3-Triclorobenceno	X	X				
1,2,4-Triclorobenceno	X	X				
1,3,5-Triclorobenceno	X	X				
Triclorometano	X	X				
Trifluralina	X	X				
Etilbenceno	X	X				
m,p-xileno	X	X				
o-xileno	X	X				
Terbutilazina	X	X				
1,1,1-Tricloroetano	X	X				
Tolueno	X	X				

CAPÍTULO 4.
DESARROLLO DE
MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1 ANÁLISIS DE AGUAS

En este capítulo se describen los métodos desarrollados para la determinación de las sustancias prioritarias descritas anteriormente. Se describen los métodos para cada una de las familias de compuestos en cada una de las matrices de estudio. Debido a la falta de métodos que se adaptaran a las necesidades requeridas, ha sido necesario desarrollar nuevos métodos o adaptar métodos ya existentes.

Para la validación de dichos métodos se analizaron muestras reales. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior las muestras de agua analizadas eran procedentes de: puntos de vertidos cuyos efluentes desembocan en el mar, zonas aguas superficiales y zonas de transición.

Todos los análisis se han llevado a cabo sobre el total de la muestra, salvo las muestras procedentes de vertidos de depuradora, que eran previamente filtradas.

4.1.1 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS

Se desarrolló un método que permite determinar 20 compuestos organoclorados fijados en la DMA en muestras de aguas, basado en microextracción en fase sólida. Los analitos utilizados para este estudio fueron: diclorometano (DCM), isómeros de triclorobenceno (TCBI, TCBI y TCBI), hexaclorobutadieno (HCB), hexaclorobenceno (HCB), pentaclorobenceno (PeCB), pentaclorofenol (PCP), isómeros de hexaclorociclohexano (α HCH, β HCH, γ HCH y δ HCH), aldrín, isodrín, endrín, dieldrín, alacloro, DDT, bromo-difenil-éter técnico (BDE). Para ello, fueron optimizadas diferentes variables con el fin de minimizar todo lo posible el tiempo y el coste del análisis. Entre las variables que podrían influir en el proceso de extracción han sido estudiadas: el tipo de polímero para SPME, el tiempo de extracción, la salinidad, la temperatura de extracción, el modo de extracción (inmersión en la muestra o espaciado de cabeza).

4.1.1.1 Optimización del método

Se prepararon disoluciones individuales de cada uno de los compuestos de concentraciones comprendidas entre 1 y 30 $\mu\text{g/L}$ para establecer los tiempos de retención. Para la optimización del método, se estudiaron distintas variables: el tiempo de extracción y desorción dentro del inyector, la salinidad, la temperatura de extracción, la extracción en el espacio de cabeza y el pH de la disolución.

Este estudio se llevó a cabo empleando un sistema de cromatografía de gases con un detector de captura de electrones (GC- μ ECD), debido a la elevada sensibilidad que ofrece este detector para compuestos halogenados.

Puesto que todas las variables estudiadas influyen en el proceso de SPME, el primer paso fue elegir el polímero adecuado para la extracción de los compuestos organohalogenados en matrices acuosas. Para ello se ensayaron varias fibras (policacrilato, polidimetilsiloxano y polidimetilsiloxano-divinilbenceno; siendo estas dos últimas las más empleadas para este tipo de compuestos (Gonçalves et al., 2002; Ratola et al., 2006). En este estudio se observó que el polímero de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) ofrecía las mayores recuperaciones para la mayoría de los compuestos de análisis.

La primera variable de estudio fue el tiempo de extracción, para ello se prepararon una serie de disoluciones a la misma concentración y se fue modificando el tiempo de extracción desde 30 hasta 60 minutos. Como se puede ver en el Figura 32 algunos analitos disminuían su respuesta con el tiempo de extracción, otros en cambio la aumentaban. Puesto que el objetivo de este trabajo era poder estudiar el mayor número de analitos en un solo análisis, el tiempo de muestreo debía ser óptimo para la mayoría de los compuestos. Por tanto, el tiempo tomado como óptimo fue 45 minutos, con el fin de mejorar la respuesta en aquellos compuestos en los que la sensibilidad del método era menor, aunque esta decisión supuso minimizar, ligeramente, la respuesta en aquellos compuestos que ofrecían una mayor sensibilidad.

Después de establecer el tiempo de extracción, se estudiaron los cambios producidos en la señal al variar el tiempo de desorción de la fibra dentro del inyector. Se probó la desorción a 1, 2 y 5 minutos. Con tal fin, se prepararon tres disoluciones de todos los compuestos a la misma concentración, obteniendo para algunos de los compuestos una mayor respuesta al aumentar el tiempo de desorción. Sin embargo, para otros compuestos la respuesta no cambiaba significativamente, por lo que se tomó como tiempo óptimo 3 minutos con el fin de no desgastar la fibra más de lo necesario.

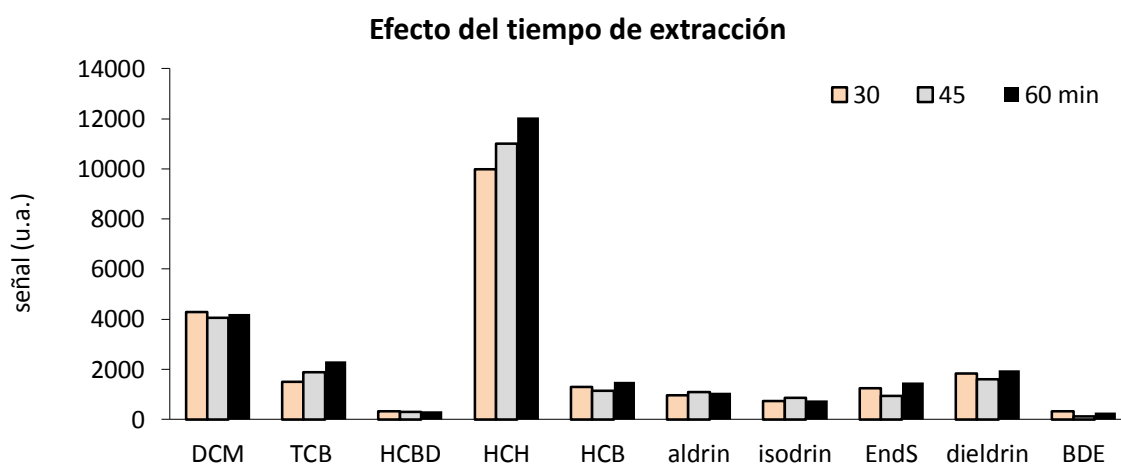


Figura 32. Influencia del tiempo de extracción dentro de la disolución.

La temperatura de extracción fue otro parámetro estudiado. Algunos de los analitos son poco solubles, por lo que podría mejorarse la extracción aumentando la temperatura de la disolución. El primer gráfico de la Figura 33 expone los resultados obtenidos para esta variable. Con el aumento de la temperatura, un aumento en la señal se observaba para algunos compuestos como el lindano, aldrín, dieldrín o endrín, siendo considerable sólo para este último; en cambio, el BDE o el triclorobenceno disminuían su señal. Considerando esto, y la facilidad de trabajar a la temperatura fijada en el laboratorio se estableció como temperatura de estudio la temperatura ambiente climatizada del laboratorio (20 ± 1 °C).

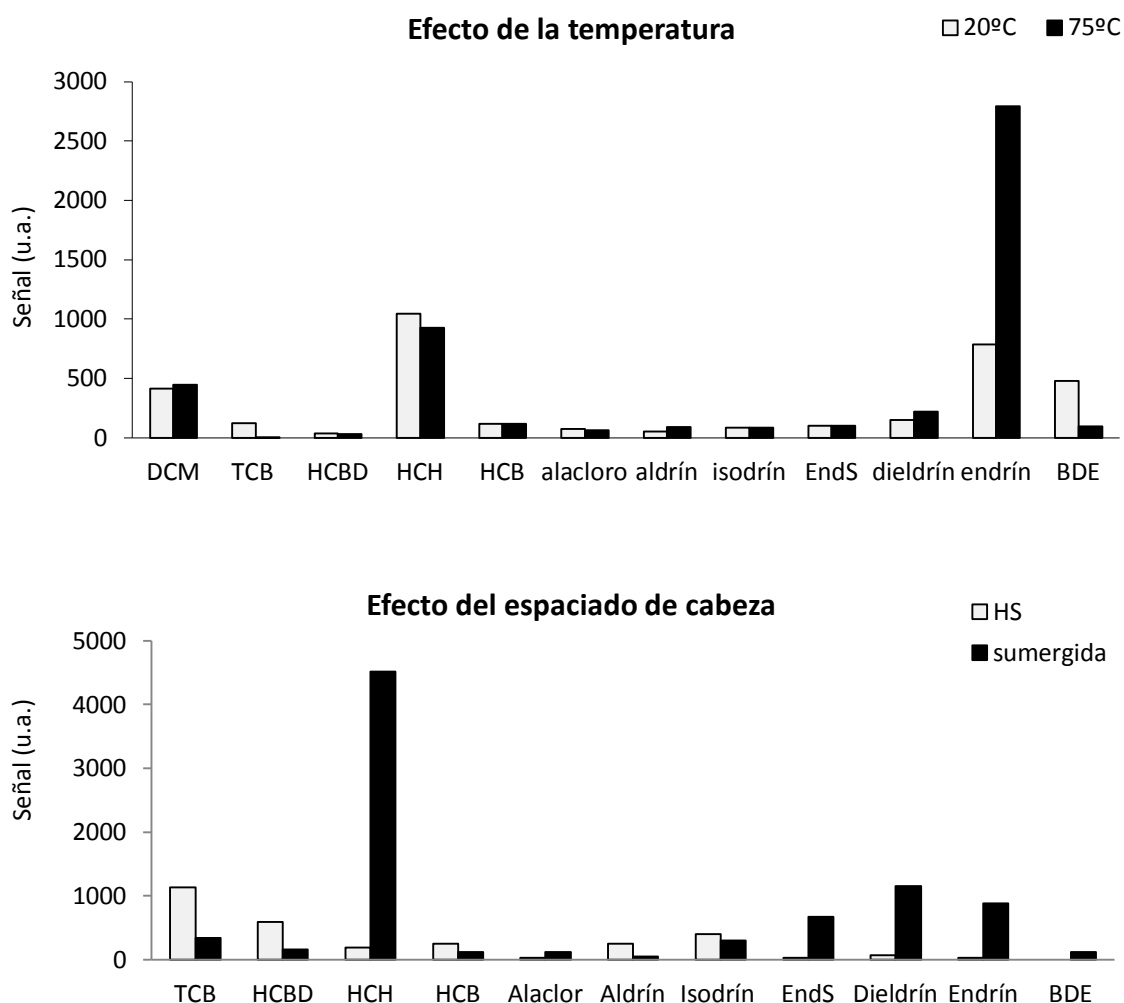


Figura 33. Influencia de la temperatura de la disolución en el momento de la extracción para algunos de los compuestos estudiados. Diferencia encontradas en la extracción en el espaciado de cabeza y dentro de la disolución.

Por otro lado, la temperatura podría afectar a la extracción dentro de la disolución para aquellos compuestos más volátiles que pasasen a la fase vapor (espaciado de cabeza o HS). En segundo gráfico de la Figura 33 se puede ver que para algunos compuestos la extracción se veía favorecida en el espaciado de cabeza. Sin embargo, esta mejora en algunos de los compuestos

era insignificante frente a la pérdida de respuesta que se observaba en otros compuestos. Al comparar los triclorobencenos con los isómeros de hexaclorociclohexano, se observaba que estos últimos aumentaban su respuesta en un orden de magnitud al introducir la fibra dentro de la disolución, mientras que los primeros apenas disminuían su respuesta. En promedio, se obtenían mejores respuestas muestreando dentro de la disolución.

La salinidad se estudió preparando dos disoluciones de 100 ng/L. A una de ellas además se le adicionó cloruro sódico hasta conseguir una concentración de éste al 3.3% (salinidad en el mar Mediterráneo). La presencia de cloruro sódico aumentaba ligeramente la respuesta para la mayoría de los analitos estudiados (Figura 34), debido a que en presencia de sal decrece la solubilidad de los compuestos orgánicos en agua, favoreciendo su adsorción en la fibra (Brás et al., 2000).

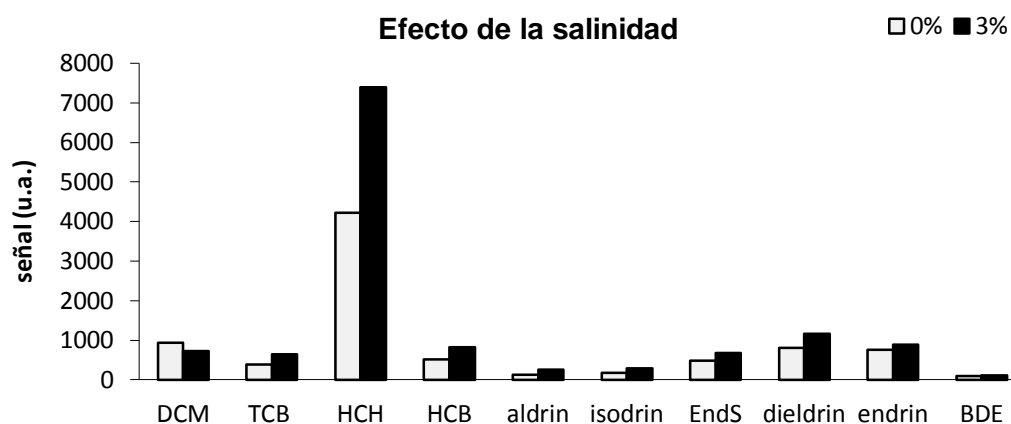


Figura 34. Influencia de la salinidad en los compuestos organoclorados

Finalmente, se estudió como afectaba el pH de la disolución al proceso de extracción. Para ello, se prepararon cuatro disoluciones a la misma concentración, dos de ellas en ausencia de cloruro sódico, a pH 5 y 7; y otras dos disoluciones a mismo pH, en presencia de cloruro sódico (3.3%). En el segundo gráfico de la Figura 35 se puede ver como la respuesta de los analitos era mayor a pH 7 en ausencia de cloruro sódico, siendo ligera la variación de respuesta en un pH ligeramente ácido. Sin embargo, en el segundo gráfico se puede ver como la respuesta en presencia de cloruro sódico, aumentaba ligeramente para pH ácido, siendo esta variación mayor en compuestos como hexaclorociclohexano.

Por lo tanto, en función del pH en el que se trabaje la presencia de iones en la matriz puede favorecer o perjudicar al proceso de extracción. En este trabajo, con el fin de modificar lo menos posible la matriz de la muestra, se procesaron las muestras no salinas en ausencia de cloruro sódico. Para el procesado de las muestras salinas, los patrones fueron preparados en

presencia de cloruro sódico. Resultados similares se observan en estudios previamente publicados (Derouiche et al., 2007).

Los valores adecuados de los parámetros estudiados, para la extracción de los compuestos organoclorados, eran: 15 mL de muestra, pH 7, temperatura ambiente (20 ± 1 °C) y manteniendo la fibra (PDMS-DVB) dentro de la muestra durante 45 minutos con agitación constante.

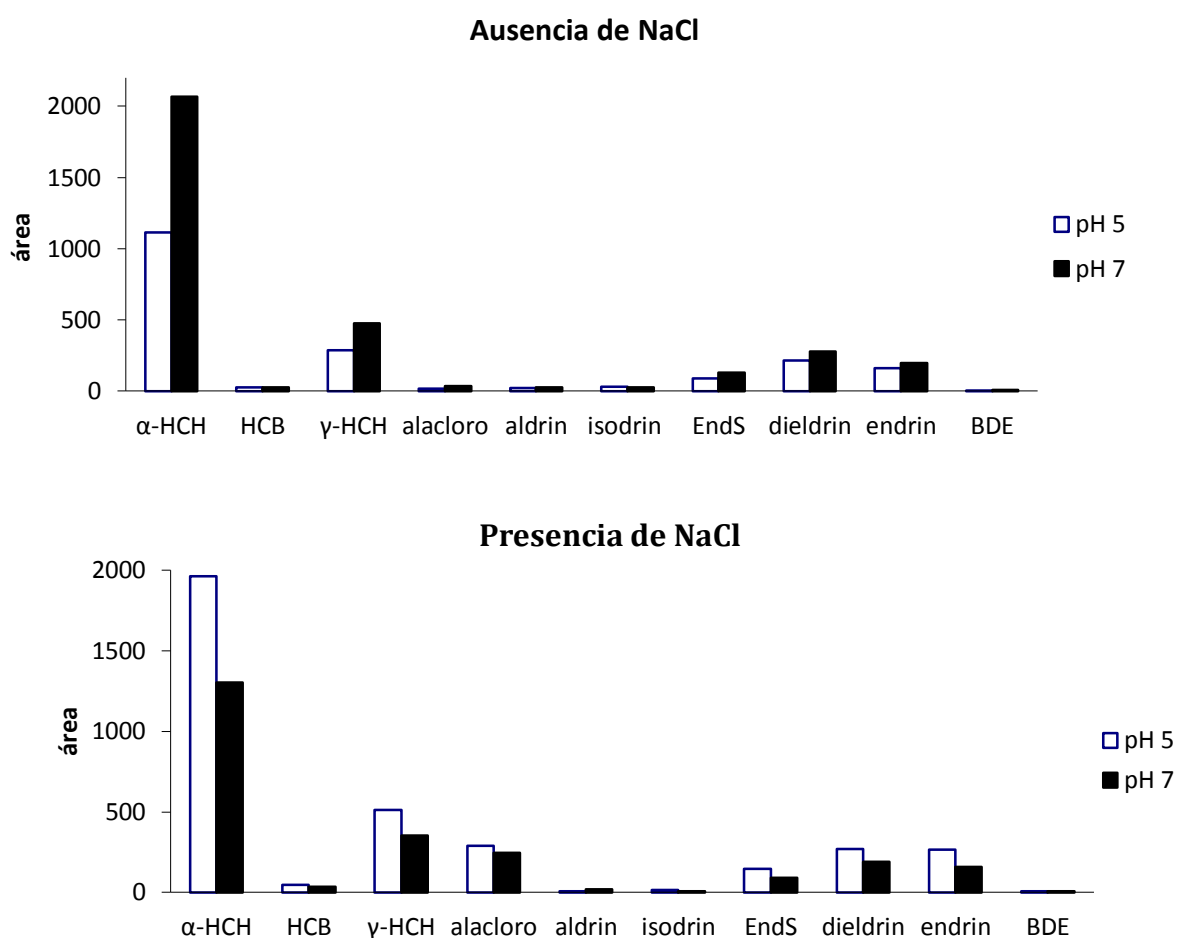


Figura 35. Efecto del pH en algunos de los compuestos estudiados en matriz acuosa en ausencia de NaCl y en matriz acuosa salina al 3% de NaCl.

4.1.1.2 Parámetros analíticos

Una vez fueron establecidas las condiciones óptimas, se procesaron distintas disoluciones para establecer los parámetros analíticos del método (Tabla 12). Se analizaron disoluciones mezcla con todos los analitos, a bajas concentraciones para establecer los límites de detección (LD) y a diferentes concentraciones para establecer el intervalo lineal. Estos fueron

determinados como la concentración que proporciona una señal 3 veces la señal del ruido de fondo.

Tabla 12. Parámetros analíticos del método desarrollado en *GC- μ ECD*

Compuesto	t_r (min)	LD(ng/L)	LQ(ng/L)	Intervalo lineal (ng/L)	$b \pm s_a$	$a \pm s_b$	r^2	RSD (%)
DCM	2.51	3	9	10-200	190 ± 18	5.5 ± 0.2	0.9857	3
TCB III	9.12	0.5	1.5	1.5-600	161 ± 21	1.9 ± 0.1	0.9865	11
TCB II	9.54	0.2	0.6	0.6-250	39 ± 44	29 ± 2	0.9736	10
HCBD	9.97	2	6	2-100	85 ± 22	2.0 ± 0.3	0.9725	6
TCB I	9.99	0.2	0.6	0.6-300	147 ± 75	14.6 ± 0.7	0.9928	7
PeCB	12.3	0.5	1.5	0.15-600	26 ± 7	13 ± 8	0.9989	9
α -HCH	15.43	0.01	0.03	0.03-600	-2130 ± 799	204 ± 4	0.9983	8
HCB	15.76	0.5	1.5	1.5-600	17 ± 7	1.23 ± 0.04	0.9960	9
β -HCH	16.26	0.5	1.5	1.5-400	26 ± 28	93.7 ± 0.2	0.9990	8
PCP	16.45	3	9	9-400	32 ± 9	0.89 ± 0.04	0.9927	7
γ -HCH	16.47	0.04	0.12	0.12-600	-363 ± 191	400 ± 10	0.9975	10
δ -HCH	17.17	0.04	0.12	0.12-500	62 ± 99	118 ± 5	0.9921	6
Alacloro	18.52	2	6	6-300	77 ± 33	9.2 ± 0.3	0.9991	8
Aldrín	19.51	2	6	6-200	-24 ± 47	7.4 ± 0.4	0.9889	8
Isodrín	20.35	0.5	1.5	1.5-800	-121 ± 102	12.6 ± 0.5	0.9926	10
Endosulfán	21.85	0.01	0.03	0.03-600	-328 ± 126	249 ± 7	0.9971	7
Dieldrín	22.85	0.02	0.06	0.06-800	-169 ± 64	167 ± 3	0.9984	10
Endrín	23.78	0.02	0.06	0.06-800	-312 ± 167	178 ± 9	0.9902	8
DDT	25.94	1	3	3-200	-122 ± 58	6.7 ± 0.6	0.979	10
BDE 99	35.50	0.1	0.3	0.3-200	70 ± 9	31.5 ± 0.9	0.9984	8

t_r : tiempo de retención LD: límites de detección. b y a : parámetros de la curva de calibrado ($n=6$). r^2 : coeficiente de determinación. RDS: desviación estándar relativa para 150 ng/L ($n=3$).

Los límites de detección que ofrecía este método estaban entre 0.01 a 3 ng/L. Todos por debajo de las normas de calidad estipuladas por la DMA, algunos de ellos siendo incluso un orden de magnitud menor que las concentraciones permitidas. El intervalo lineal de los compuestos, dentro del cual se pueden interpolar las concentraciones observadas a partir de la curva de calibrado, se estableció preparando disoluciones mezcla a distintas concentraciones a partir del límite de cuantificación (LQ 10 veces el ruido de fondo). Los coeficientes de determinación obtenidos estaban en el intervalo 0.9506-0.9991. En general, estos coeficientes obtenidos para los compuestos analizados se consideraban aceptables, salvo para aldrín y DDT

que presentaban una correlación baja ($r^2=0.95$ y 0.96). Para el estudio de la repetibilidad se prepararon tres disoluciones mezcla de 150 ng/L . Los valores de desviación estándar relativa obtenidos fueron inferiores al 11%, de modo que el método se consideró preciso.

4.1.1.3 Aplicación a muestras reales

Para la validación del método, una muestra blanca fue utilizada como matriz, con la cual se estudió la reproducibilidad y repetibilidad, así como intervalo lineal y límites de detección. Además, fueron procesadas muestras reales de diferente procedencia: efluentes de depuradoras, aguas superficiales costeras y aguas superficiales de transición. El análisis se llevó a cabo tomando 15 mL de las muestras que eran trasvasados a viales de vidrio de 22 mL , adicionando una barra magnética para la agitación, una disolución de cloruro sódico era adicionada en los casos que era necesario. El tiempo de extracción fue de 45 minutos con agitación constante, manteniendo la fibra de SPME sumergida dentro de la muestra.

Tabla 13. Resultados obtenidos para muestras reales de agua

Comp	N muestras			Muestras detectadas (%)			Muestras cuantificadas (%)			Concentración máxima ($\mu\text{g/L}^{-1}$)		
	ww	tw	cw	ww	tw	cw	ww	tw	cw	ww	tw	cw
TCB	28	18	41	61	11	27	25	72	-	0.3600	0.005	0.005
HCBD	28	18	41	25	39	10	-	-	-	0.0017	0.0015	0.0015
HCH	28	18	41	43	50	20	46	6	-	0.0850	0.0037	0.0005
HCB	28	18	41	14	28	12	-	-	-	0.0015	0.0013	0.0015
PCP	28	18	41	36	28	22	4	-	-	0.0510	0.002	0.0023
PeCB	28	18	41	-	-	-	25	28	15	0.0230	0.017	0.0036
Alaclor	28	18	41	14	-	24	-	-	5	0.0038	-	0.0083
Aldrín	28	18	41	4	-	7	-	-	-	0.0020	-	0.0023
Isodrín	28	18	41	7	-	20	-	-	2	0.0020	-	0.0033
EndS	28	18	41	32	28	22	14	6	-	0.0430	$8.33\text{E-}05$	$7.50\text{E-}05$
Dieldrín	28	18	41	11	-	5	-	-	-	0.00013	-	0.00015
Endrín	28	18	41	21	11	12	11	-	-	0.0048	0.00015	0.00015
BDE	28	18	41	7	-	-	-	-	-	$6.6667\text{E-}05$	-	-

ww. Vertidos. tw. Agua de transición, cw. Aguas costeras. LOD. Límite de detección.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y la exactitud del método fue evaluada fortificando una tercera réplica con los analitos de estudio. Como se puede observar en la Tabla 13 todos los analitos fueron detectados en las muestras, especialmente en las procedentes de vertidos de depuradora.

4.1.1.4 Conclusiones

El método propuesto permite el análisis simultáneo de 20 compuestos organoclorados, en muestras acuosas. Además, ofrece buena sensibilidad por lo que resulta útil para el análisis de muestras ambientales, en las que éstos se encuentran a niveles de traza. Los límites de

detección son adecuados considerando los niveles exigidos por la normativa vigente en política de aguas.

El empleo de SPME como técnica de extracción permite la preconcentración de la muestra de forma rápida y sencilla, eliminando posibles interferencias presentes en este tipo de matrices. Otros autores han extraído este tipo de compuestos de matrices acuosas mediante extracción en fase sólida (Baugros et al., 2008; Hildebrandt et al., 2008). Sin embargo, esta técnica es menos sensible y los límites de detección obtenidos suelen ser mayores.

Por otro lado, la determinación de estas sustancias por GC- μ ECD ofrece una elevada sensibilidad con límites de detección mucho menores que los obtenidos con un detector de espectrometría de masas (Sakamoto y Tsutsumi, 2004). En la Tabla 14 se detalla a modo de comparación el método desarrollado en este trabajo y algunos métodos propuestos por otros autores.

Tabla 14. *Referencias bibliográficas relativas al análisis de organohalogenados en aguas*

Compuesto	LD (ng/L)	Pretratamiento	Polímero	Técnica	referencia
p,p-DDT	17,6	SPE	C18	GC-MS	Baugros et al., 2008
o,p-DDT	20,6	SPE	C18	GC-MS	Baugros et al., 2008
Hexaclorobenceno	3	LLE	-	GC-ECD	Fatta et al., 2007
Hexaclorobutadieno	0,6	LLE	-	GC-ECD	Fatta et al., 2007
Endrín	3	LLE	-	GC-ECD	Fatta et al., 2007
DDT	4	LLE	-	GC-ECD	Fatta et al., 2007
1,2,4-Triclorobenceno	2	LLE	-	GC-ECD	Fatta et al., 2007
Organohalogenados	0,01-3	SPME	PDMS-DVB	GC- μ ECD	Este trabajo

4.1.2 DETERMINACIÓN DE CLOROALCANOS (C10-13)

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 1 de este trabajo, los cloroalcanos de cadena corta son mezclas complejas de n-alcanos policlorados, por lo que su análisis resulta muy complejo. Son muy pocos los estudios que se han centrado en la determinación de éstas en muestras ambientales. En este trabajo se estudiaron diferentes procedimientos para la extracción y el análisis de cloroalcanos de cadena corta en muestras acuosas, todos ellos basados en la SPME.

4.1.2.1 Optimización del método

Algunos métodos de extracción de cloroalcanos (C10-13) en muestras acuosas se han basado en la extracción líquido-líquido (Tomy et al., 1997), otros en el empleo de SPME como técnica de preconcentración (Castells et al. 2003).

El primer paso en la optimización de este método fue la elección de la fibra adecuada, considerando que estos compuestos tienen un peso molecular elevado y que el tamaño de molécula es relativamente grande al tratarse de largas cadenas de carbono. Entre los polímeros cuyo mecanismo es la adsorción, las de Carboxeno y DVB son comúnmente utilizadas. Según lo descrito, cuanto mayor sea el tamaño de poro más favorable será la extracción, resultando las fibras de DVB las más adecuadas (Shirey, 2000). Por otro lado, entre los polímeros cuyo mecanismo es la absorción, las fibras más utilizadas por otros autores son las de PDMS. Este tipo de fibras es recomendado para moléculas de elevado peso molecular, ya que son las que ofrecen un tamaño de poro mayor.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, para este estudio se ensayó la extracción con fibras de PDMS (100 μ m) y fibra de PDMS-DVB (65 μ m). Se tomaron 15mL de agua MilliQ en un vial de 22mL y se fortificaron a una concentración de 5 μ g/L, éstos fueron extraídos con ambas fibras por triplicado. Los resultados observados mostraban que la fibra de PDMS-DVB (65 μ m) era la más adecuada, ya que ofrecía mayores recuperaciones que la fibra de PDMS.

Entre los factores que pueden influir en el proceso de extracción con SPME, el tiempo de extracción es de los más importantes. Por ello, se ensayó la extracción a diferentes tiempos: 15, 30, 45 y 60 minutos. Dada la baja volatilidad de cloroalcanos (C10-13) la fibra se mantuvo sumergida dentro de la disolución con agitación constante para favorecer la difusión de los analitos desde la fase acuosa hasta la superficie de la fibra.

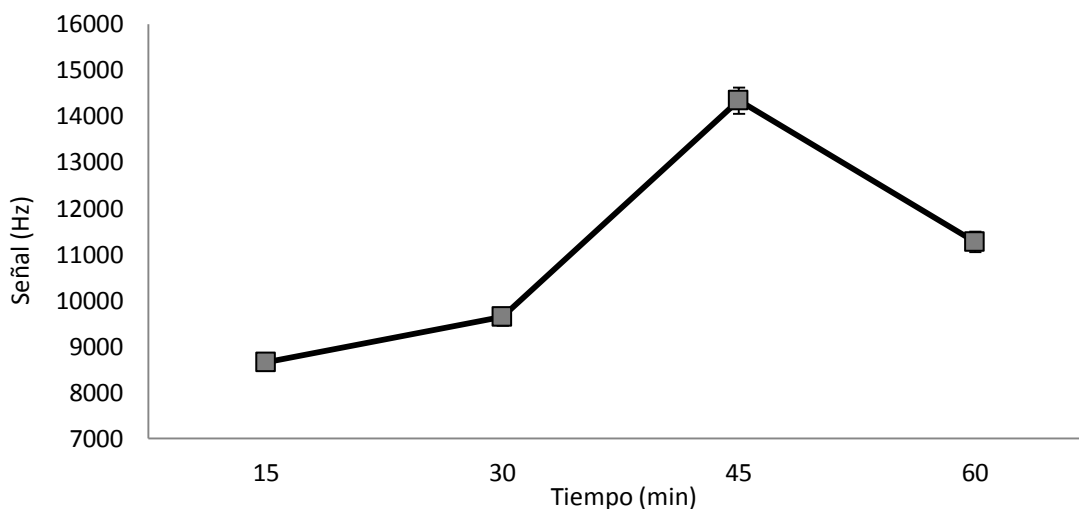


Figura 36. Influencia del tiempo de extracción para SCCP en muestras acuosas

En la Figura 36 se puede observar cómo afecta el tiempo de extracción en la retención de los cloroalcanos. A 15 y 30 minutos la extracción era relativamente baja, en cambio al aumentar el tiempo de extracción a 45 minutos la respuesta aumentaba considerablemente. Al aumentar el tiempo de extracción hasta 60 minutos se observaba una disminución en la respuesta obtenida. Finalmente, el tiempo de extracción óptimo se fijó en 45 minutos.

Generalmente, el efecto iónico mejora la eficiencia en los procesos de extracción con SPME. Sin embargo, para compuestos con baja solubilidad en agua el efecto iónico suele tener un efecto contrario en la extracción de los analitos (Pan et al., 1995), este hecho fue también observado por Castells et al. (2003). Considerando los datos bibliográficos, la salinidad fue una variable no modificada y las muestras no salinas fueron procesadas en ausencia de sal.

Las condiciones óptimas establecidas fueron: 15 mL de muestra en vial de 22 mL, extracción con fibra de PDMS-DVB (65 μm) durante 45 minutos con agitación constante empleando para ello una barra magnética (20 mm x 6 mm).

4.1.2.2 Parámetros analíticos

Tras fijar las condiciones óptimas en la SPME, se prepararon diferentes disoluciones para establecer los parámetros analíticos del método. Los límites de detección y cuantificación fueron calculados experimentalmente como la menor concentración analizada que generaba una respuesta igual a tres y diez veces la respuesta generada por el ruido de fondo, respectivamente. Para ello, se analizaron diferentes muestras blancas incentivadas a distintas concentraciones. El límite de detección y cuantificación que ofrecía el método propuesto era 0.18 $\mu\text{g/L}$ y 0.54 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. La linealidad fue determinada preparando una serie de disoluciones entre

0.54 µg/L y 10 µg/L. El coeficiente de determinación (r^2) obtenido fue 0.9924, los valores de desviación estándar relativa (RSD) con réplicas en un mismo día, para patrones de 5 µg/L (n=3), fue del 5%, el RSD para diferentes sesiones fue 13%. En la Tabla 15 se indican estos parámetros analíticos.

La cuantificación de las SCCP resulta muy complicada dada la complejidad de estas sustancias, muchos autores para facilitar la cuantificación emplean detector de masas que permite la cuantificación de los iones por separado (Eljarrat et al., 2006). Para comprobar la sensibilidad y selectividad del sistema GC-µECD, se realizó un estudio en el sistema GC-MS. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que en el sistema GC-µECD y se trabajó en modo Full Scan para obtener el espectro de masas de las cloroalcanos (C10-13), y de este modo, establecer los iones más específicos de éstas que fueron: 70, 75, 91, 102 y 286, similares a los resultados obtenidos por otros autores (Castells et al, 2004; Zencak et al., 2004). El análisis en modo SIM (select ion monitoring) fue realizado con patrones a bajas concentraciones, las mismas concentraciones empleadas en el sistema GC-µECD. Como era de esperar, el sistema GC-MS es más selectivo pero menos sensible en la determinación de compuestos clorados.

4.1.2.3 Aplicación a muestras reales

Las muestras fueron tomadas de 24 zonas costeras de la Comunidad Valenciana. El análisis se llevó a cabo tomando 15 mL de las muestras, sin previo tratamiento, en viales de vidrio de 22 mL, el tiempo de extracción fue fijado en 45 minutos con agitación constante, manteniendo la fibra de SPME sumergida dentro de la disolución. Todas las muestras fueron procesadas con el método descrito por duplicado, para valorar la exactitud una tercera réplica fue incentivada con una disolución patrón de SCCP.

Tabla 15. *Parámetros analíticos del método desarrollado y valores obtenidos en muestras de agua para su validación.*

Parámetros analíticos		Columna de agua de biota (µg/L)	Columna de agua de sedimento(µg/L)
LD (µg/L)	0.18	N muestras	52
LQ (µg/L)	0.54	N= nd	24
Precisión ^a (R.S.D.%)	5	N= LD	2
Precisión ^b (R.S.D.%)	13	N>LD	-
		Min	nd
		Max	0.18

^aanálisis a análisis(n=3) ^bdía a día (n=3)
nd. No detectado

La cloroalcanos (C10-13) sólo fueron detectadas en dos de las muestras analizadas procedentes de la columna de agua por encima de las muestras de sedimentos, resultados similares han sido publicados por Castells et al. (2003). Moore et al. (2003) justifica la no presencia de estas sustancias en muestras acuosas debido a la insolubilidad de éstas en agua y su tendencia a quedar retenidas en la fase particulada. En la Tabla 15 se reflejan los resultados obtenidos para las muestras de agua analizadas.

4.1.2.4 Conclusiones

El método propuesto basado en el empleo de SPME para la extracción de SCCP de muestras acuosas, permite la determinación de estas a bajas concentraciones y de una forma sencilla, rápida y económica, ya que no requiere el empleo de disolventes orgánicos ni reactivos para la modificación de la muestra.

Entre las variables estudiadas, las condiciones óptimas observadas en este trabajo fueron el empleo de fibras de PDMS-DVB en lugar de las fibras de PDMS. La extracción fue llevada a cabo con la fibra sumergida en la disolución durante 45 minutos con agitación constante. Finalmente, la determinación de SCCP mediante cromatografía de gases se llevó a cabo con un detector de captura de electrones por ofrecer una mayor sensibilidad, ya que la espectrometría de masas, que permite determinar los iones específicos, es una técnica más selectiva pero menos sensible.

4.1.3 DETERMINACIÓN DE ORGANOESTÁNNICOS

En este apartado se ha desarrollado un método analítico para la determinación de compuestos organoestánnicos en muestras acuosas. Las sustancias analizadas fueron: tributilo (TBT), trietilo (TET), difenilo (DPhT) y trifenilo (TPhT) de estaño. Para ello, se estudiaron dos sistemas cromatográficos, cromatografía de gases con detector FID y cromatografía de gases con detector masas. Como técnica de preconcentración de la muestra se empleó SPME, para la cual se estudiaron diferentes parámetros que pueden afectar en el proceso de extracción. Los compuestos debían ser derivatizados previamente debido a la baja volatilidad para ser analizados mediante cromatografía gaseosa.

4.1.3.1 Optimización del método

En la optimización del método se estudiaron variables que podrían afectar al proceso de extracción, y por consiguiente a la sensibilidad en la detección de estos compuestos. Las variables estudiadas fueron: cantidad de derivatizante, salinidad, tiempo de extracción, volumen de solución y volumen de espaciado de cabeza. Todos estos ensayos se llevaron a cabo en el sistema GC-FID.

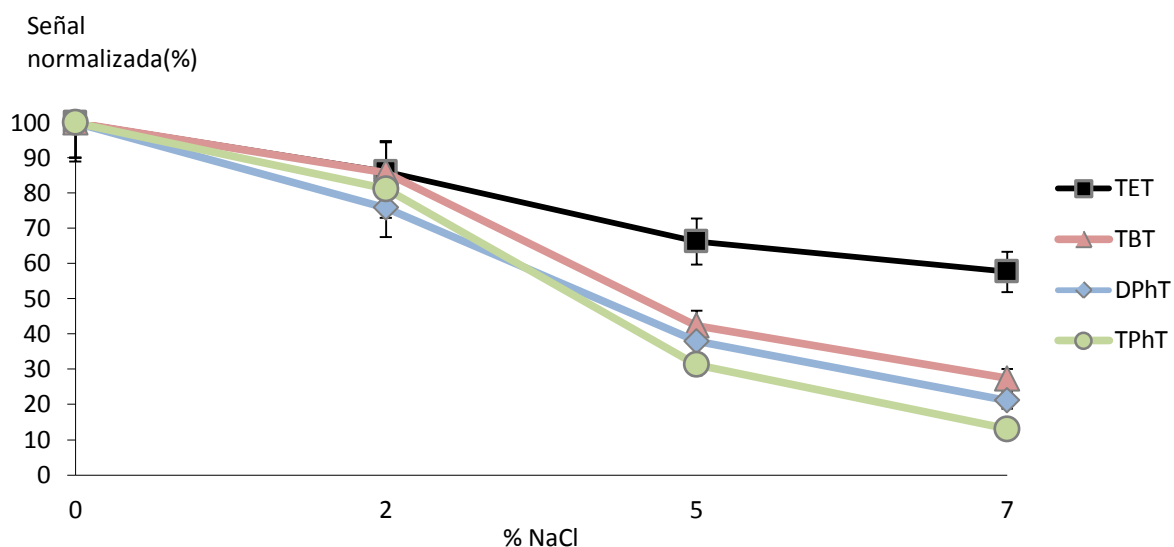


Figura 37. Influencia de la salinidad.

Para el estudio del efecto de la salinidad se ensayaron patrones con distintas cantidades de cloruro sódico, desde 0% hasta 7%. En la Figura 37 se puede ver cómo afecta la salinidad a cada uno de los analitos, disminuyendo todos ellos la señal al aumentar la cantidad de cloruro sódico en la disolución. Especialmente, en el caso de TPhT esta disminución de señal se hace más notable en el intervalo 2-5% de cloruro sódico. A la vista de los resultados las muestras no salinas han sido analizadas en ausencia de sal; en cambio, los patrones eran tratados con una

solución salina al 3.3% cuando se procesaban muestras procedentes del mar mediterráneo dada la salinidad de éste.

Debido a la baja volatilidad de estos compuestos, como ya se ha mencionado anteriormente, éstos debían ser derivatizados. Algunos autores han propuesto la derivatización utilizando reactivos de Grignard para alquilación de los compuestos (Rapsomanikis, 1994) o generando hidruros empleando borohidruro sódico (Jiang et al, 1999). Sin embargo, estos métodos requieren medios estrictamente apróticos para la derivatización, por lo que otros métodos de alquilación han ganado importancia en los últimos años, como la alquilación con tetraetilborato de sodio (STEB) o tetrapropilborato de sodio (STPB). En este trabajo la derivatización se realizó empleando STEB que, debido a su inestabilidad, era conservado en un desecador, a su vez situado dentro de una bolsa bajo atmósfera inerte de nitrógeno, todo ello ubicado dentro de una campana extractora. El patrón empleado en la derivatización fue un patrón acuoso al 2% preparado diariamente y guardado en nevera a 5°C.

Como ya se ha comentado uno de los objetivos de este trabajo era desarrollar procedimientos de coste efectivo. Atendiendo a esta razón, el volumen de derivatizante se ensayó desde 0.3 mL hasta 1 mL de disolución al 2% (w/v), con la intención de minimizar la cantidad de reactivo consumida y, a su vez, modificando lo mínimo posible los resultados. La diferencia entre los resultados obtenidos no era significativa con respecto al volumen requerido, por lo que se eligió 0.3 mL como volumen óptimo de reactivo. Además, resultaba recomendable trabajar con la menor cantidad de derivatizante, ya que un exceso de éste podría generar TET e interferir en el análisis (Schubert et al, 2000). El pH es otra de las variables que influye en la derivatización de los analitos. Basado en la bibliografía, se tomó un pH 5, ya que a este pH la reacción de derivatización es más efectiva (Chi-Chi Chou et al., 2005).

Una vez fijada la concentración de NaCl y el volumen de derivatizante, se modificaron los tiempos de extracción, variando el tiempo de permanencia de la fibra dentro del espaciado de cabeza sobre la disolución desde 15 hasta 60 minutos, con agitación constante debido a que la agitación de la muestra favorece la cinética de derivatización (Carvalho et al, 2007). Es importante considerar que el derivatizante era añadido a la muestra justo en el instante en el que se iba a extraer, de modo que cuando se habla de tiempo de extracción, se sobreentiende que no sólo cuenta el tiempo necesario para la absorción de los analitos en la fibra sino también el tiempo necesario para que tenga lugar la reacción de derivatización. Como se puede ver en la Figura 38, el TBT ofrece una mayor extracción a los 30 minutos, disminuyendo su respuesta al pasar este tiempo; sin embargo, el resto de los compuestos estudiados dan una respuesta totalmente inversa, aumentado la cantidad de analito extraído con el tiempo de extracción, dando la mayor respuesta a los 60 minutos. Por ello, se tomó como tiempo de extracción 45 minutos para conseguir la mejor respuesta posible de todos los analitos.

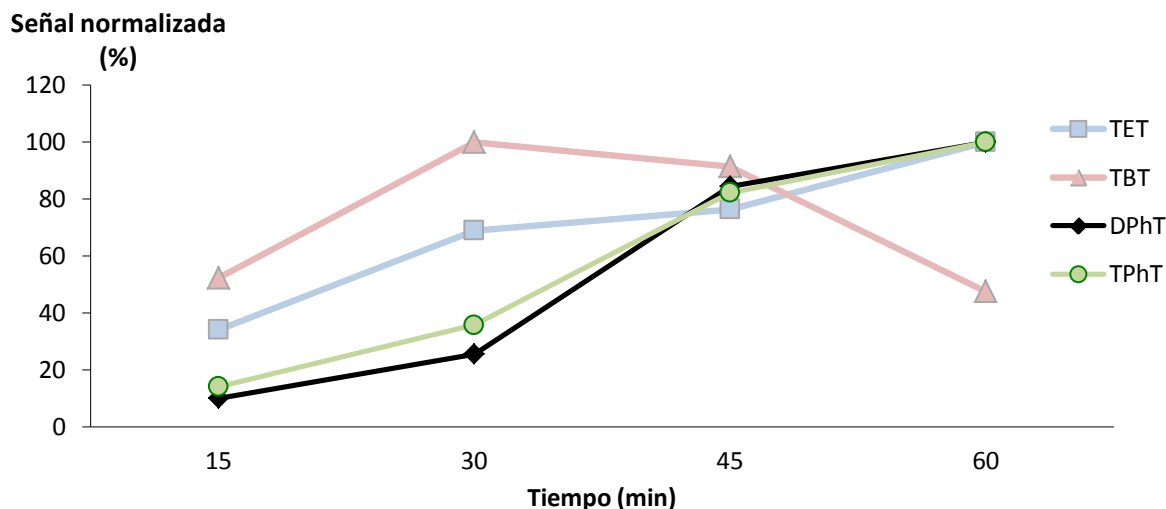


Figura 38. Influencia del tiempo de extracción.

Posteriormente, se estudió la influencia del volumen de disolución con la intención de miniaturizar el método, y de este modo consumir la menor cantidad posible de muestra así como de reactivos. Se pretendía comprobar si la fibra llegaba al equilibrio con un menor volumen. La muestra fue analizada en viales de 22 mL y viales de 5 mL, utilizando 14 mL y 2.8 mL, respectivamente, como volumen de muestra. En el Figura 39 se puede ver que la cantidad de analito extraída era mayor cuanto mayor era el volumen de muestra, aunque estas diferencias no eran significativas. En este trabajo se optó por utilizar un volumen total (muestra y reactivos) de 14 mL, pero se podría trabajar con volúmenes miniaturizados si fuera necesario.

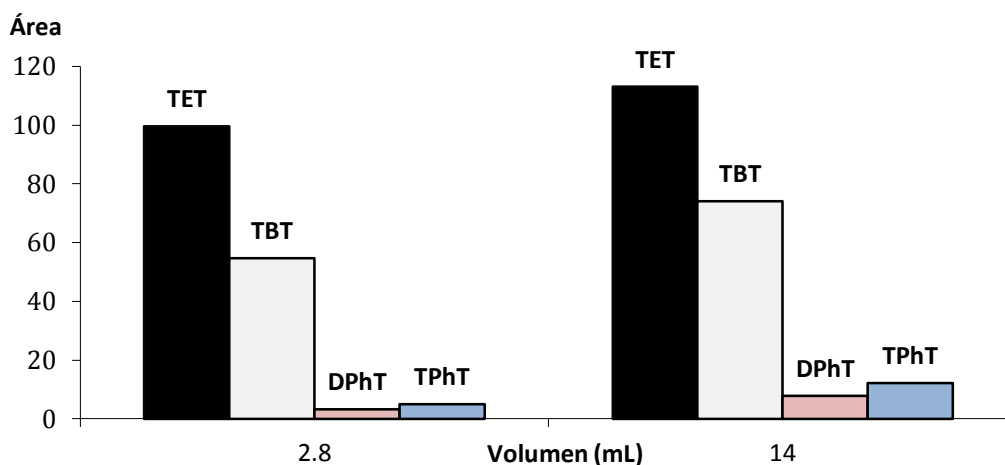


Figura 39. Influencia del volumen de disolución para los compuestos analizados

A la vista de los resultados, las condiciones óptimas para la extracción de los compuestos de estaño en agua eran: 12.7 mL de muestra, 0.3 mL de derivatizante, 1 mL de tampón de

AcH: AcNa (pH 5) y ausencia de NaCl. Sin embargo, para la preparación de patrones se utilizó una disolución de NaCl de concentración similar a la muestras analizadas (3.3%). Empleando una fibra de PDMS para la extracción durante 45 minutos.

4.1.3.2 Parámetros analíticos

Para la obtención de los parámetros analíticos se prepararon distintos patrones en metanol de cada uno de los reactivos, y a partir de éstas se preparaban diariamente las disoluciones acuosas. Se prepararon disoluciones a distintas concentraciones en un intervalo entre 1 y 10 µg/L para tributilo, difenilo y trietilo de estaño y disoluciones con concentraciones entre 10 y 40 µg/L para el trifenilo. De este modo, se obtenían los tiempos de retención de cada compuesto a la vez que se establecía el intervalo lineal.

Una vez establecidos los tiempos de retención de cada compuesto, se procedió a establecer el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) de cada uno de los analitos, a partir de las concentraciones que proporcionaban 3 y 10 veces, respectivamente, la señal del ruido de fondo. Las concentraciones utilizadas para la determinación de los límites de detección fueron de 1, 2 y 5 µg/L para el trifenilo de estaño y de 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 µg/L para tributilo, difenilo y trietilo de estaño. Cada una de las disoluciones analizada era comparada con un blanco, donde la señal tomada como límite de detección de cada compuesto estudiado era tres veces mayor que la proporcionada, al tiempo de retención de cada analito, por el blanco. Para estudiar la repetibilidad del método se procesaron tres disoluciones a la misma concentración (10 µg/L).

Los coeficientes de determinación obtenidos por este método ofrecían valores en el intervalo 0.9599-0.9918, DPhT y TPhT poseían una buena correlación lineal ($r^2 > 0.99$). Además, la precisión del método para todos los compuestos se podía considerar aceptable a los niveles de concentración ensayados, ya que eran menores al 12%. Todos estos parámetros se exponen en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetros analíticos del método desarrollado en GC-FID

compuesto	tr (min)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	$b \pm s_b$ (µg/L)	$a \pm s_a$ (µg/L)	r^2	RSD (%)
TET	5.9	0.1	0.3	7 ± 7	6.9 ± 0.8	0.9756	8
TBT	10.2	0.1	0.3	4 ± 9	11.2 ± 0.9	0.9860	9
DPhT	13.6	0.1	0.3	-4 ± 9	5.1 ± 0.3	0.9918	4
TPhT	16.6	1	3	-6 ± 8	6.1 ± 0.5	0.9961	12

tr: tiempo de retención. LD: límites de detección. LQ: límite de cuantificación. b y a : parámetros de la curva de calibrado. r^2 : coeficiente de determinación. RDS: desviación estándar relativa para $10 \mu\text{g/L}^{-1} (n=3)$.

La Figura 40 representa el cromatograma obtenido para un patrón de concentración 15 $\mu\text{g/L}$ procesado en el sistema GC-FID, se observa que el ruido de fondo generado es elevado por lo que no es posible llegar a límites de detección de los órdenes de magnitud exigidos por la normativa vigente (200 pg/L). Por este motivo, se decidió ensayar el sistema GC-MS.

Debido a la gran sensibilidad que ofrece el sistema GC-MS las concentraciones necesarias para establecer los parámetros analíticos fueron mucho menores que para el sistema GC-FID. El procedimiento seguido fue el mismo que en el sistema anterior. Diferentes disoluciones de concentraciones en el rango 1-5000 ng/L fueron preparadas para determinar los tiempos de retención de tributilo, difenilo y trietilo de estaño, y disoluciones de concentración entre 5-5000 ng/L para determinar los tiempos de retención del trifenilo de estaño. Estas mismas disoluciones fueron empleadas para establecer los intervalos lineales y los iones específicos de cada analito.

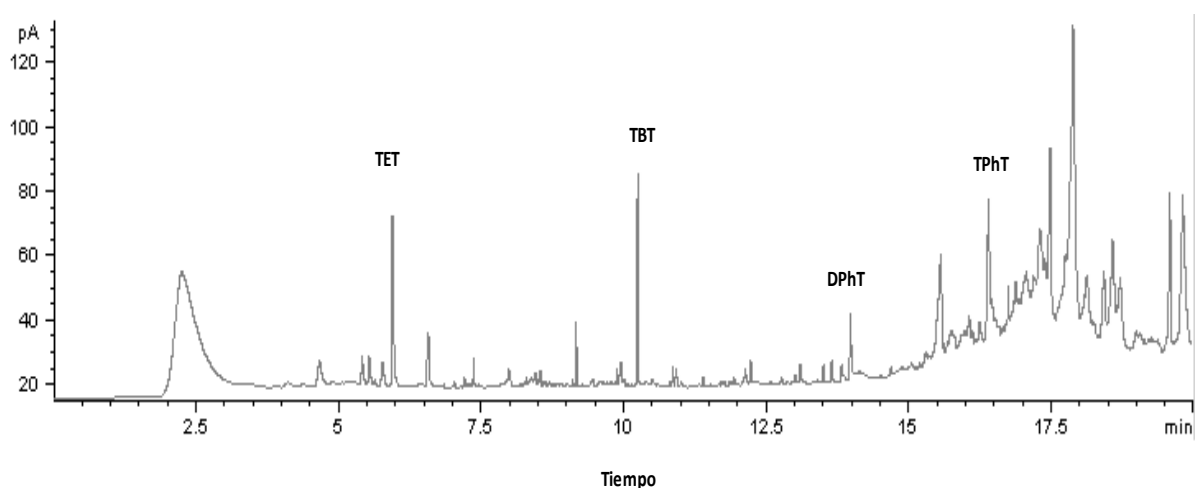


Figura 40. Cromatograma obtenido con el sistema GC-FID para un patrón de los cuatro analitos a una concentración de 15 $\mu\text{g/L}$ de cada uno.

Para obtener el espectro de masas de cada compuesto (Figura 41), se trabajó en modo *full scan* en un rango para la relación masa/carga de 100 a 400 m/z . De este modo se obtuvo el ión más abundante, además de otros iones menos abundantes. Los espectros obtenidos son similares a los ofrecidos por la librería NIST (National Institute of Standards and Technology) (Belkin et al., 1997). Estos iones permiten determinar los analitos de forma más selectiva que trabajando con otros detectores. En la Tabla 17 se resumen los datos obtenidos a partir de los cromatogramas: ion de cuantificación, iones característicos, y estructura química de estos iones para cada compuesto estudiado.

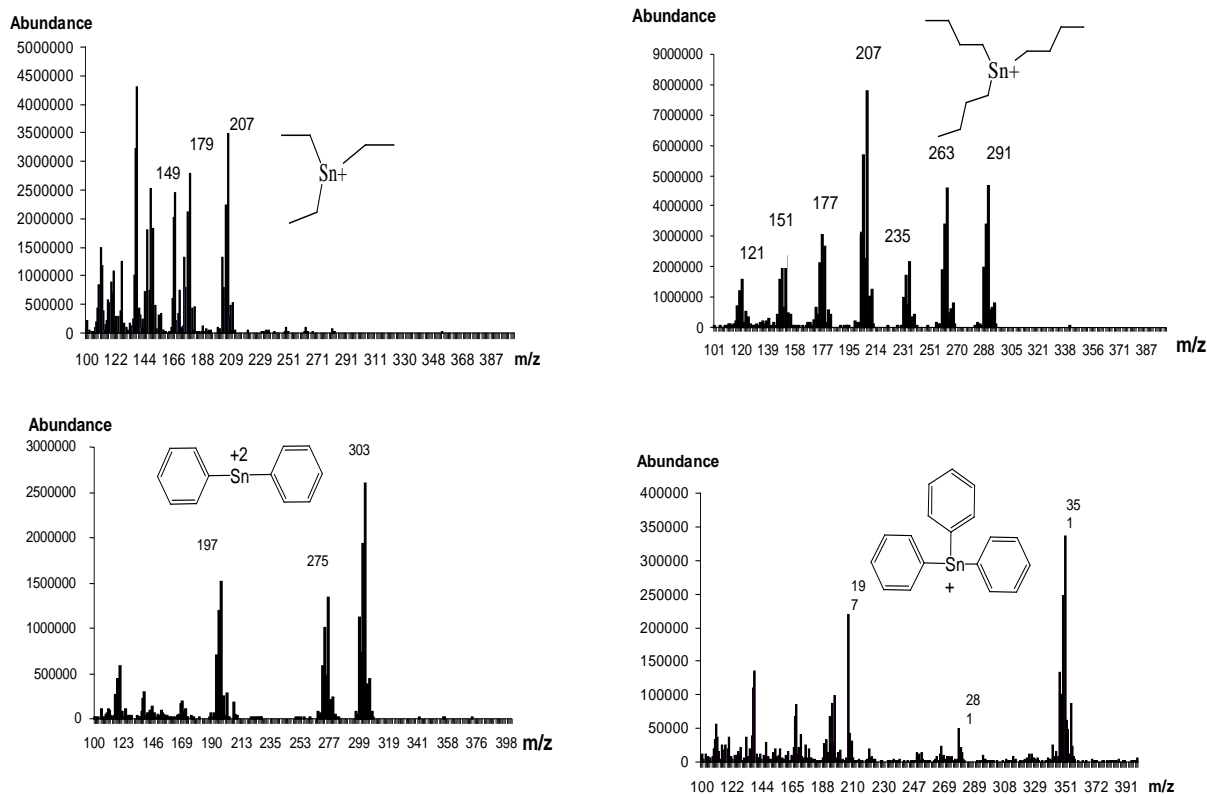


Figura 41. Espectro de masas para TET, TBT, DPHT, TPHT.

Tabla 17. Iones característicos de cada compuesto y sus correspondientes estructuras

Compuesto	Ion de cuantificación	Fórmula Química	Iones característicos	Fórmula Química
TET	179	SnEt ₂ H	149	SnEtH ₂
			207	SnEt ₃
TBT	291	SnBu ₃	121	SnH ₃
			151	SnEtH ₂
			177	SnBuH ₂
			207	SnEtBuH
			235	SnEt ₂ Bu
			263	SnEtBu ₂
DPHT	303	SnEtPh ₂	197	SnPhH
			275	SnPh ₂ H
TPHT	351	SnPh ₃	197	SnPhH
			281	SnEt ₃ Ph

Una vez establecidos los tiempos de retención, se prepararon una serie de disoluciones para determinar el límite de detección, límite de cuantificación y, posteriormente, el intervalo lineal. Las soluciones preparadas fueron 0.5, 1, 2 y 5 ng/L para el TET y TPHT, y 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25 ng/L para TBT y DPHT. Los límites de detección así como los parámetros analíticos del método desarrollado se presentan a continuación (Tabla 18).

Los límites de detección obtenidos con este método eran de un orden de magnitud menor que los obtenidos con el sistema GC-FID. Además, estos LD se encuentran por debajo de los valores fijados como NCA en la legislación vigente. Los coeficientes de determinación obtenidos estaban en el intervalo 0.9831-0.9971. Todos los compuestos excepto el DPhT poseen una buena correlación lineal, la repetibilidad del método se estudió con tres disoluciones de 5 ng/L cada una, donde para todos los compuestos se obtuvieron valores de RSD menores al 20%.

Tabla 18. *Parámetros analíticos del método desarrollado en GC-MS.*

compuesto	tr (min)	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	$b \pm s_b$ ($\mu\text{g/L}$)	$a \pm s_a$ ($\mu\text{g/L}$)	r^2	RSD (%)
TET	4.6	1	3	$(3 \pm 3) \times 10^5$	$(5.6 \pm 0.1) \times 10^6$	0.9967	11
TBT	9	0.025	0.075	$(4 \pm 4) \times 10^4$	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^6$	0.9940	9
DPhT	12.3	0.025	0.075	$(3 \pm 5) \times 10^4$	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^6$	0.9831	20
TPhT	15.6	0.5	1.5	$(1 \pm 1) \times 10^4$	$(0.5 \pm 0.1) \times 10^6$	0.9971	12

tr: tiempo de retención LD: límite de detección. LQ: límite de cuantificación. b y a: parámetros de la curva de calibrado(n=6). r^2 : coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa para 5ng/L (n=3).

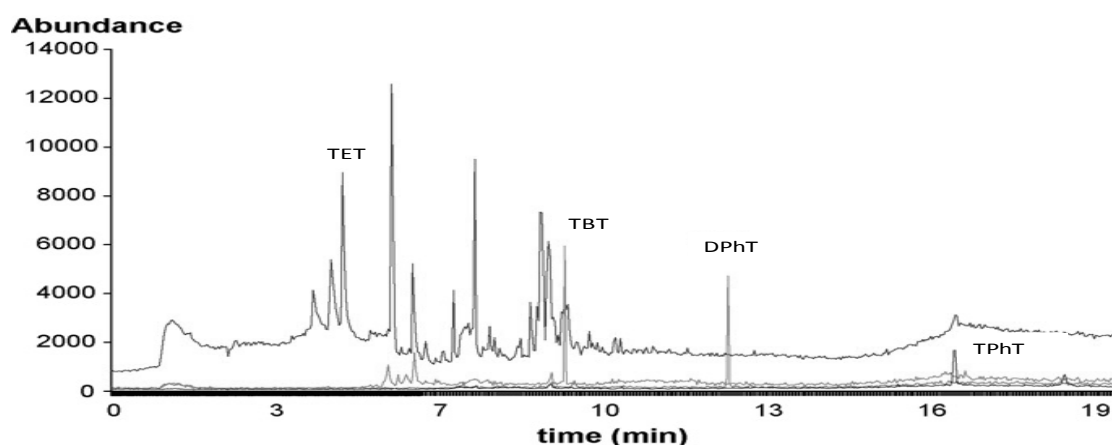


Figura 42. Cromatograma obtenido con el sistema GC-MS para un patrón de concentración de 5 ng/L para TET, TBT y DPhT y 10 ng/L para TPhT.

La Figura 42 representa el cromatograma obtenido para un patrón de concentración 10 $\mu\text{g/L}$ analizados mediante el sistema GC-MS en el modo SIM. Como se puede observar, este detector es más sensible a la determinación de estos compuestos que el detector de ionización de llama (FID). Trabajando en el modo del ion selectivo se alcanzan límites de detección del orden de magnitud que exige la normativa para estos compuestos en aguas.

4.1.3.3 Aplicación a muestras reales

El método optimizado fue aplicado a muestras reales de diferentes matrices. Las muestras procedían de 7 efluentes de depuradoras. Además, se tomaron muestras de 24 zonas geográficas diferentes de la Comunidad Valenciana.

El análisis se llevó a cabo tomando 12.7 mL de las muestras en viales de vidrio de 22 mL, y adicionando: 1 mL de disolución tampón AcH:AcNa (pH 5), 0.3 mL de disolución derivatizante (STEB) y una barra magnética para la agitación. El tiempo de extracción fue de 45 minutos con agitación constante, manteniendo la fibra de SPME en el espaciado de cabeza.

Las muestras se analizaron por duplicado. Además, una tercera replica fue fortificada con los analitos para evaluar la exactitud del método. Las recuperaciones obtenidas para todos los analitos se incluían en el intervalo 90 ± 20 ($n=12$). Entre las muestras de efluentes de depuradora analizadas se observó la presencia de DPhT a niveles del límite de detección en dos de las muestras. En cuanto a aguas costeras, TBT fue detectado en 11 de las muestras a niveles del límite de detección, y en una de ellas próxima a una zona portuaria fue detectado a una concentración de 1.3 ± 0.3 ng/L. Esta concentración superaba la norma de calidad establecida por la Directiva 2008/105/CE (0.2 ng/L). Por otro lado, el DPhT fue detectado en una muestra a una concentración de 0.14 ± 0.04 ng/L.

4.1.3.4 Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos para los parámetros de calibración (Tabla 16 y Tabla 18), se puede concluir que el detector MS es mucho más sensible a la detección de este tipo de analitos.

El método de extracción con SPME trabajando en espaciado de cabeza junto con cromatografía de gases propuesto permite trabajar en el análisis de compuestos de estaño en muestra acuosa reduciendo las cantidades de ésta, así como los volúmenes de reactivos. Es un método que, además de sencillo, ofrece adecuados parámetros analíticos para el estudio de compuestos organoestánicos en este tipo de muestras. Los límites de detección que aporta son del orden de pg/L, por debajo de las normas de calidad establecidas por la normativa vigente, esto lo hace un método muy útil para el análisis medioambiental. La Tabla 19 expone los resultados obtenidos por otros autores en el análisis de compuestos organoestánicos en muestras acuosas.

Tabla 19. Referencias bibliográficas relativas al análisis de organoestánicos en aguas

Compuesto	LD (ng/L)	Pretratamiento	Técnica	Reactivo Derivantizante	Tiempo total de análisis (min) ^a	Volumen de muestra (mL)	referencia
TET	48.8	SPME	GC-FID	STEB	30	20	Bravo et al., 2006
TBT	0.5	SPME	GC-MS	STEB	45	5	Chi-Chi Chou et al., 2005
	7-29	LLE	GC-HRMS	STEB	90	100	Ikonomou et al., 2002
	4	SPME	GC-FPD	STEB	60	100	Jiang et al., 1999
	4	SPME	GC-FPD	STEB	60	100	Jiang et al., 1999
	17.5	HS-SPME	GC-PFPD	STEB	50	80	Arrambarri et al., 2003
	2500	SPME	GC-FID	STEB	30	18	Bravo et al., 2006
	0.525	HS-SPME	GC-AED	STEB	40	40	Schubert et al., 2000
	0.55	HS-SPME	GC-AED	STPB	40	40	Schubert et al., 2000
DPhT	7-29	LLE	GC-HRMS	STEB	90	100	Ikonomou et al., 2002
	2	SPME	GC-FPD	STEB	60	100	Jiang et al., 1999
	7	SPME	GC-FPD	STEB	60	100	Jiang et al., 1999
	26.37	HS-SPME	GC-PFPD	STEB	50	80	Arrambarri et al., 2003
	0.465	HS-SPME	GC-AED	STEB	40	40	Schubert et al., 2000
	0.44	HS-SPME	GC-AED	STPB	40	40	Schubert et al., 2000
TPhT	7-29	SPME	GC-MS	STEB	45	5	Chi-Chi Chou et al., 2005
	4.6	LLE	GC-HRMS	STEB	90	100	Ikonomou et al., 2002
	3	SPME	GC-FPD	STEB	60	100	Jiang et al., 1999
	11	SPME	GC-FPD	STEB	60	100	Jiang et al., 1999
	0.125	SPME	GC-ICPMS	STEB	45	40	Rapsomanikis, 1994
	0.63	HS-SPME	GC-AED	STEB	40	40	Schubert et al., 2000
	0.39	HS-SPME	GC-AED	STPB	40	40	Schubert et al., 2000

a: valor estimado; STEB: tetraetilborato de sodio; STPB: tetrapropilborato de sodio.

4.1.4 DETERMINACIÓN DE FENOLES

En este apartado se detalla el desarrollo de un método basado en la combinación de cromatografía líquida capilar con detección electroquímica para la determinación de fenoles en muestras acuosas. Para ello, se han optimizado los diferentes parámetros del detector electroquímico: rango, potencial y filtro, en diferentes condiciones cromatográficas (El equipo se puede ver en la Figura 29, capítulo 2). Los derivados fenólicos estudiados fueron: fenol, 2-clorofenol, o-cresol y bisfenol A. Este método, que permite el análisis de muestras ambientales sin la necesidad de preconcentración de los analitos, ha sido publicado con el título: “*A direct Capillary Liquid Chromatography with electrochemical detection method for determination of phenols in water samples*” (Anexo II).

4.1.4.1 Optimización del método cromatográfico

Los estudios iniciales para la optimización de la detección electroquímica se llevaron a cabo con un patrón de fenol de 10 $\mu\text{g/L}$ y una fase móvil acetonitrilo: 2mM KCl (35:65). Considerando el tiempo óptimo de uso del electrodo de referencia ISAAC se empleó siempre KCl en la fase móvil. El rango se estudió en el intervalo 1 a 10 nA/V con el filtro y el potencial fijados en 1 y 0.80 V, respectivamente. La Figura 43 representa la influencia del rango en la línea base, estudiada analizando un blanco en las condiciones previamente descritas, donde se puede ver que la mejor línea base ofrecida por el detector era para un valor de rango de 1 nA/V.

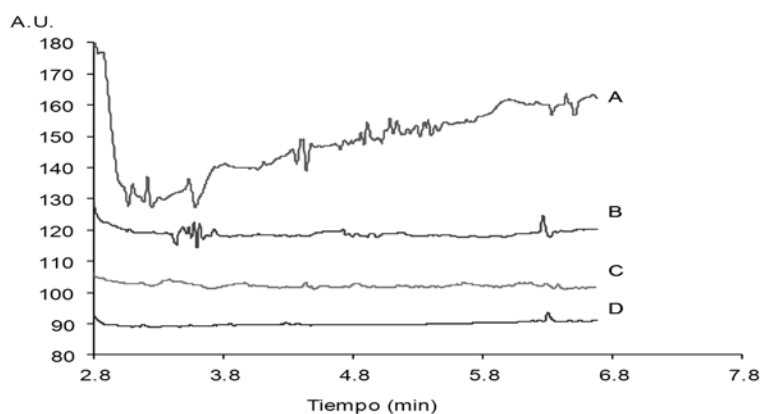


Figura 43. Influencia en la línea base del valor de rango del detector EC para un blanco (A) 10, (B) 5, (C) 2 y (D) 1 nA/V. 2 μL volumen de inyección, fase móvil ACN: 2mM KCl (35:65). Filtro 1 y potencial 0.80V.

El intervalo de filtro estudiado fue entre 0.2 y 5, con valores fijados de las otras variables. El rango se fijó en su valor óptimo, 1 nA/V, y el potencial a 0.8 V. Aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de filtro el valor que ofrecía la mejor señal era 1. Finalmente, el intervalo de potencial estudiado fue entre 0.7 y 0.9 V, para los otros parámetros ya fijados en su valor óptimo (rango 1 nA/V y filtro 1). Como se puede vislumbrar de

la Figura 44 el valor óptimo para el potencial fue 0.85 V, en ésta se ha representado la señal normalizada para los tres parámetros.

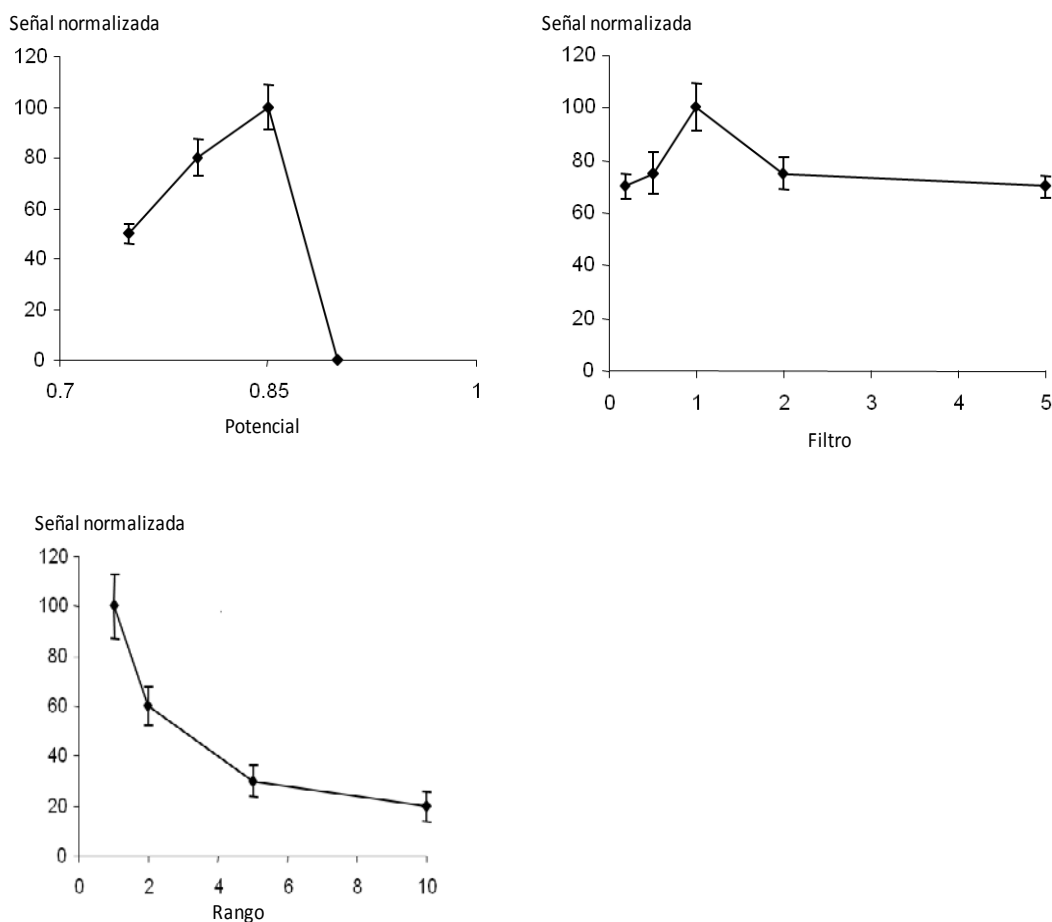


Figura 44. Señal normalizada para rango, filtro y potencial

Una vez fijados los parámetros electroquímicos óptimos, se estudiaron volúmenes de inyección entre 2 y 20 μL , empleando en todo momento una fase móvil de acetonitrilo: 2mM KCl (35:65). Este estudio se llevó a cabo con una mezcla de fenol, o-cresol, 2-clorofenol, y BPA. La resolución, R_s , obtenida con la válvula de loop 2 μL era mucho mejor que las otras, siendo 1.9, 0.3 y 3.5 las $R_{s_{\text{fenol-ocresol}}}$, $R_{s_{\text{ocresol-2clorofenol}}}$ y $R_{s_{\text{2clorofenol-BPA}}}$, respectivamente. Los otros volúmenes de loop ofrecían una peor resolución debido al pequeño diámetro de la columna. Un hecho similar ha sido observado por Parrot et al., 2007.

Con el fin de mejorar la resolución entre o-cresol y 2-clorofenol, se estudió la composición de la fase móvil. Para ello, se prepararon dos fases móviles acetonitrilo y 2mM KCl 35:65 y 30:70, de este estudio se concluyó que esta última ofrecía un aumento en la resolución del cromatograma, incrementándose hasta $R_{s_{\text{fenol-ocresol}}}$ 4.8, $R_{s_{\text{ocresol-2clorofenol}}}$ 2 y $R_{s_{\text{2clorofenol-BPA}}}$ 8.5.

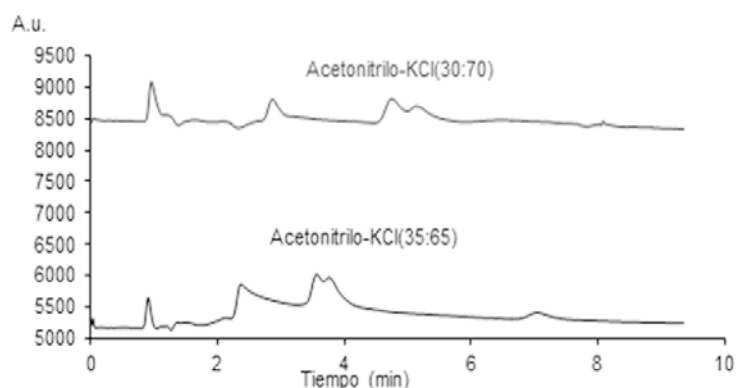


Figura 45. Cromatograma de las fases móviles utilizadas.

4.1.4.2 Parámetros analíticos

Los límites de detección se determinaron por inyecciones sucesivas de patrones de 1 a 5 $\mu\text{g/L}$, obteniendo límites de detección de 1 y 2 $\mu\text{g/L}$ para BPA que proporcionaron señales iguales a tres veces el ruido de fondo. El intervalo lineal de los compuestos se estableció preparando disoluciones mezcla de los cuatro analitos a distintas concentraciones a partir del límite de cuantificación (10 veces el ruido de fondo), donde los coeficientes de determinación obtenidos estaban en el intervalo 0.9860-0.9998. Los valores de desviación estándar relativa (RSD) se determinaron con réplicas preparadas el mismo día, que se determinaron para una mezcla de 10 $\mu\text{g/L}$ de los cuatro compuestos ($n=3$), cuyos valores se encontraban entre 2 y 4% (Tabla 20)

Tabla 20. Parámetros analíticos del método

compuesto	tr (min)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)	Intervalo lineal	$b \pm s_b$ ($\mu\text{g/L}$)	$a \pm s_a$ ($\mu\text{g/L}$)	r^2	RSD(%)
Fenol	2.40	1	3	3-50	518 ± 13	1611 ± 78	0.9988	2
o-cresol	3.48	1	3	3-50	239 ± 28	303 ± 187	0.9860	2
2-clorofenol	3.74	1	3	3-50	675 ± 71	4634 ± 959	0.9891	2
BPA	6.80	2	6	6-50	138 ± 5	130 ± 31	0.9988	4

tr: tiempo de retención LD: límite de detección. LQ: límite de cuantificación. b y a: parámetros de la curva de calibrado($n=6$). r^2 : coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa para 10 $\mu\text{g/L}$ ($n=3$).

4.1.4.3 Aplicación a muestras reales

El método desarrollado fue aplicado a muestras de aguas reales tomadas de distintos puntos de vertido de efluentes al mar. Se filtraron con un filtro de nylon de 0.45 μm y se

procesaron directamente de igual forma que la disolución patrón. Antes de inyectar las muestras en el sistema cromatográfico se filtraron con filtro de muestras de 0.45 μm con carcasa de plástico y de acero inoxidable.

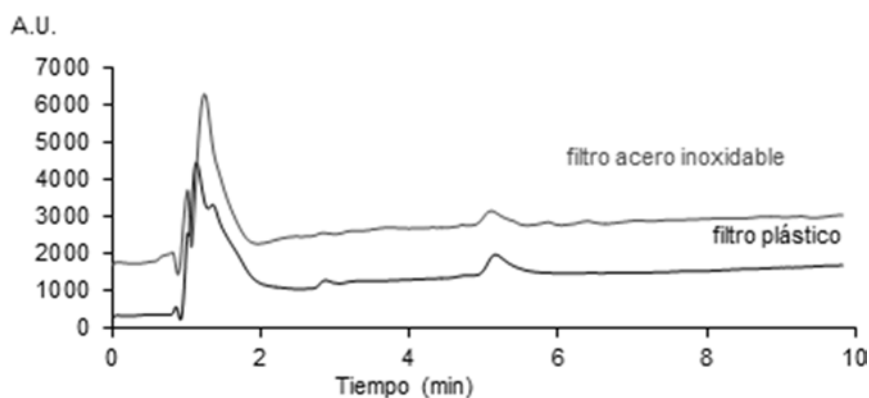


Figura 46. Cromatograma de los filtros utilizados.

En primer lugar se ensayaron distintos materiales contenedores de filtros de nylon de muestra, plástico y acero inoxidable como se ve en la Figura 46. El filtro de plástico proporcionó una línea base más estable, por lo que se eligió esta opción para el filtrado de las muestras, previo al análisis cromatográfico.

En el análisis de las muestras se ensayaron distintas fases móviles para obtener una mayor resolución en los picos 2 y 3, o-cresol y 2-clorofenol, respectivamente. La fase móvil escogida para el estudio de las muestras fue acetonitrilo-cloruro potásico 2mM (30:70) ya que como se puede ver en la Figura 47 los analitos se separan y resulta más fácil su análisis.

Finalmente, se procesaron distintas muestras en las condiciones descritas. Figura 47 presenta los cromatogramas correspondientes a: blanco, disolución mezcla de 10 ppb y una muestra. Se observa la presencia de fenol y 2-clorofenol en la muestra analizada, a concentraciones $3.7 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ y $14.9 \pm 0.6 \mu\text{g/L}$, respectivamente.

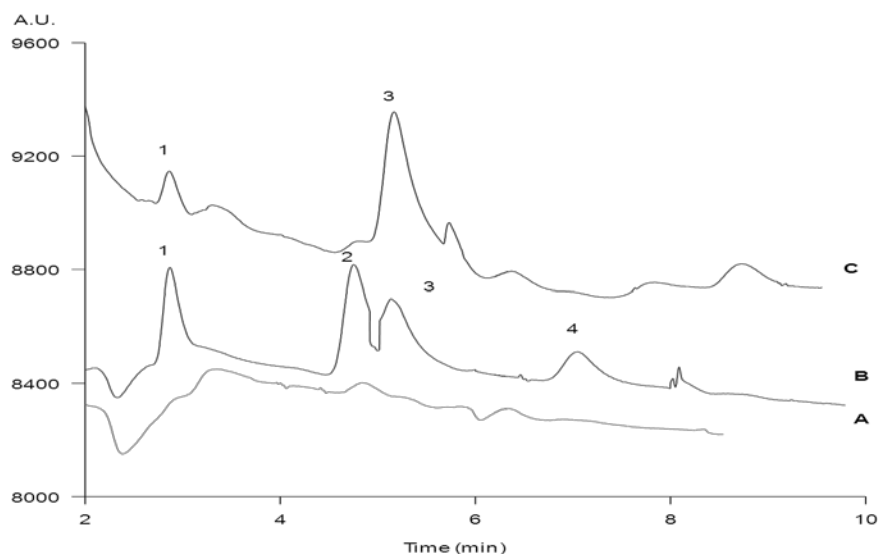


Figura 47. Cromatograma de blanco (A), patrón (B) y muestra acuosa (C), en condiciones: Rango 1nA/V, Filtro 1 y Potencial 0.85V. 1: fenol, 2: o-cresol, 3: 2-clorofenol y 4: BPA.

4.1.4.4 Conclusiones

La combinación de cromatografía líquida capilar con detección electroquímica ofrece la posibilidad de analizar fenoles en muestras ambientales, concretamente en muestras acuosas sin la necesidad de etapas previas de preconcentración. El método propuesto ofrece buena sensibilidad y límites de detección comparables con otros trabajos previamente publicados en los que se utilizan técnicas de preconcentración y pretratamiento para las muestras (Tabla 21).

Tabla 21. Referencias bibliográficas relativas al análisis de fenoles en aguas

Muestra acuosa	Pretratamiento				Separación/ Técnica de detección	LD µg/L	Ref.
	Preconcentración		Derivatización				
	Técnica	Tiempo (min)	Reagent	Tiempo (min)			
Lago	LLME	25	-	-	HPLC-UV	0.5-0.6	Liu et al., 2007
Rio y desecho	SPME	33	-	-	HPLC-UV	0.2-3.7	Pan et al., 2008
Mar y agua de grifo	SPME	120	-	-	HPLC-UV	0.9-3.8	Li et al., 2009
Lago, grifo y estanque	UAHS	20	-	-	HPLC-UV	6-23	Xu et al. 2007
Mar y lago	SBSE	60	-	-	HPLC-UV	1.0-2.6	Huang et al., 2008
Agua potable e industrial	-	-	C6SCI*	20	HPLC-FI	0.1-0.9	Suliman et al., 2006
Rio y desecho	SPME	32	-	-	HPLC-EC	0.02-4.5	Peñalver et al., 2002
Agua mineral y agua de grifo	En columna	62	-	-	LC-capilar-UV	0.004-0.013	Ruiz-Jimenez et al., 2007
Efluente de depuradora	No requerido	-	No requerido	-	LC-capilar-EC	1-2	Este trabajo

a Cloruro de coumarin-6-sulfonil

4.2 ANÁLISIS DE BIOTA

Tal y como se ha indicado en el punto 3.5.5, para el desarrollo de este trabajo se procesaron muestras de mejillones y tellinas, recogidas en diferentes puntos geográficos de la costa de la Comunidad Valenciana. Estos organismos fueron seleccionados por ser considerados organismos bioindicadores de la contaminación marina y por ser abundantes en la zona de estudio. Los mejillones se hallan en zonas rocosas, mientras que las tellinas se encuentran en playas de arena en contacto con el sedimento. La cantidad de agua filtrada por estos organismos puede variar en función del tamaño de éste y de la especie concreta, en el caso del *mejillón zebra* puede variar entre 5-400 mL/h en función del tamaño.

Para la recogida de las muestras en las diferentes campañas, se trató, en la medida de lo posible, de seleccionar ejemplares de tamaño similar. Las muestras fueron liofilizadas, trituradas mediante un molino de bolas y conservadas hasta su análisis. Todas las muestras fueron tratadas previamente para su análisis del mismo modo.

4.2.1 DETERMINACIÓN DE ORGANOHALOGENADOS

En este apartado se describen diferentes procedimientos miniaturizados para la extracción y determinación de compuestos organoclorados (OCPs) y compuestos polibromados (BDEs) en muestras de biota. Entre los compuestos organoclorados que marca la DMA se seleccionaron aquellos con una elevada capacidad de bioacumulación, como son: hexaclorobutadieno (HCB), isómeros del hexaclorociclohexano (α HCH, β HCH, δ HCH y lindano o γ HCH), hexaclorobenceno (HCB), pentaclorobenceno (PeCB) y polibromo-difenil-éteres (BDE). Los diferentes métodos ensayados se basan en extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), para lo cual se ensayaron diferentes soportes sólidos (C_{18} o Florisil®), análisis por inyección directa y con preconcentración SPME, además se analizaron por FID y μ ECD. La parte experimental se ha publicado en el trabajo: *“Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection”* (Anexo II).

4.2.1.1 Optimización del método

Tres procedimientos de extracción diferentes fueron estudiados modificando el soporte sólido: con Florisil® y sílica gel, sólo con C_{18} y C_{18} -Florisil®.

El procedimiento 1 se basaba en el trabajo realizado por Martínez et al. (2005) para la extracción simultánea de compuestos organoclorados y bromo-difenil-éteres. Diferentes

cantidades de muestra fueron ensayadas (0.05, 0.25, 0.5 g), éstas fueron fortificadas con los analitos de estudio y homogeneizadas con 0.15 g de Florisil® en un mortero de cerámica. Posteriormente, se trasvasaba a un cartucho de SPE (3 mL) que contenía 1 g de sílica gel, previamente acidificada con H₂SO₄(44%), los analitos eran eluidos con 2 mL de hexano. Los extractos se hacían pasar por un cartucho de SPE (3 mL) que contenía 0.2 g de sílica gel neutra. Entonces, los analitos eran eluidos con mezclas de etilacetato: hexano (30:70) y de los extractos 5 µL eran inyectados en un sistema GC-FID.

En la Figura 48A se pueden observar las recuperaciones obtenidas para algunos de los analitos estudiados. La recuperación obtenida con 0.05 g para YHCH era demasiado baja, en cambio la recuperación para el hexaclorobenceno era superior al 100%, posiblemente debido a alguna interferencia co-eluída con éste. El empleo de hexano como eluyente empeoraba las recuperaciones para los analitos, salvo para los PBDEs. El uso de sílica gel empleado para eliminar los lípidos no favorecía la extracción ya que también retenía a los compuestos menos polares.

En el procedimiento 2 fue estudiada la capacidad de un único soporte sólido como dispersante y retenedor de la grasa. Para ello, diferentes cantidades de muestra (0.1, 0.25 y 0.5 g) fueron incentivadas y homogeneizadas en un mortero con 0.4 g de C₁₈, la mezcla fue trasvasada a un cartucho de SPE (3 mL) y los analitos eran eluidos con 1.3 mL de hexano.

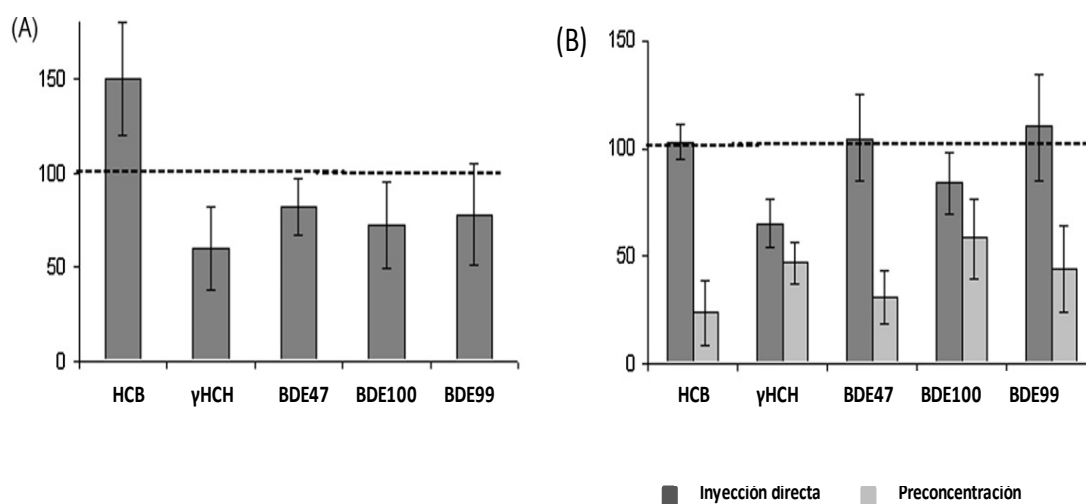


Figura 48. Recuperaciones obtenidas: A) procedimiento 1, B) procedimiento 2 con y sin preconcentración.

Por un lado, los extractos fueron concentrados con una corriente de nitrógeno, reconstituidos en 150 µL de hexano e inyectados en un sistema GC-FID. Las recuperaciones con este procedimiento se situaron entre 60 y 110% como se puede observar en la Figura 48B, pero debido al empeoramiento de la línea base tras la concentración, la cuantificación de los analitos

a bajas concentraciones resultaba inviable. En la Figura 49 se puede ver el cromatograma obtenido para un blanco y el cromatograma obtenido para la muestra concentrada.

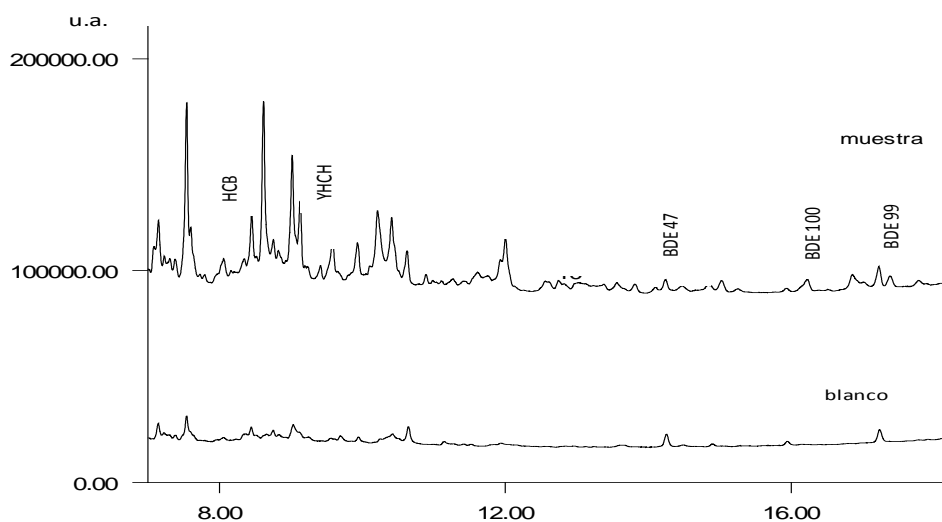


Figura 49. Cromatograma de blanco y muestra fortificada procesada con C₁₈.

Por otro lado, los extractos eran preconcentrados por SPME durante 45 minutos y agitación constante, utilizando para ello una fibra de PDMS-DVB, que como ya se estudió para la determinación de compuestos organoclorados en muestras acuosas, este polímero era el que mejores resultados ofrecía, y finalmente eran analizados con el sistema GC- μ ECD. Las recuperaciones obtenidas al preconcentrar los analitos con SPME fueron muy bajas.

El procedimiento 3 se basa en el método propuesto por Campíns-Falcó et al. (2008) para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de biota, que no requiere pretratamiento. Con este procedimiento 0.1 g de muestra liofilizada era homogeneizada en un mortero con 0.4 g de C₁₈, y trasvasada a un cartucho de SPE (3 mL) que contenía 0.1 g de Florisil® como soporte sólido. Por una parte, los analitos fueron eluidos con 1.2 mL de hexano, el disolvente eliminado a sequedad con una corriente de nitrógeno y los analitos reconstituidos en 150 μ L de hexano, de los cuales 5 μ L se inyectaban en un sistema de GC- μ ECD.

Por otra parte, los analitos fueron eluidos con 1.2 mL de acetonitrilo (ACN). Los extractos fueron analizados por inyección directa, tras eliminar el disolvente con una corriente de nitrógeno y ser reconstituidos en 150 μ L de ACN. La respuesta obtenida al extraer los analitos con ACN era mayor que la respuesta obtenida con hexano (Figura 50).

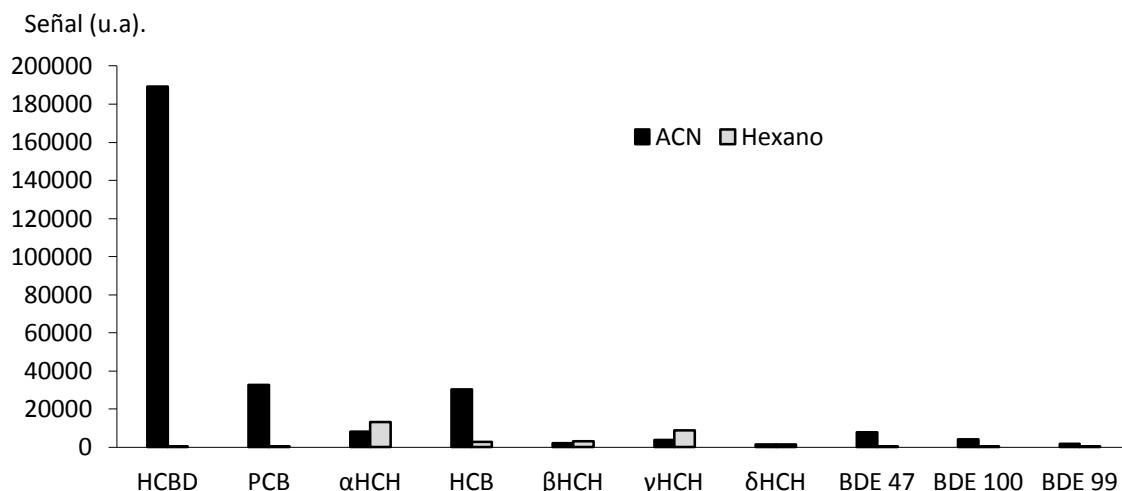


Figura 50. MSPD procedimiento 3 con elución con ACN y hexano

Además, se ensayó la preconcentración con SPME para este procedimiento. Sobre los extractos se añadieron 2.6 mL de agua MilliQ para ser extraídos con PDMS durante 45 min y agitación constante. Ambos ensayos fueron analizados con un sistema de GC- μ ECD. En la Figura 51 se puede observar que la recuperación obtenida al aplicar preconcentración es mucho mayor que la obtenida por inyección directa, para la mayoría de los compuestos excepto para hexaclorobutadieno, posiblemente debido a la volatilidad de éste que favorece su desplazamiento hasta la fase gas durante el período de extracción. El efecto contrario se observaba al aplicar SPME a los extractos con hexano del procedimiento 2, esto era debido a que los analitos en solución acuosa presentan una mayor afinidad por la fibra. Sin embargo, en presencia de un disolvente apolar, como hexano, éstos presentan una mayor afinidad por el solvente y la difusión hasta la fibra es más pobre.

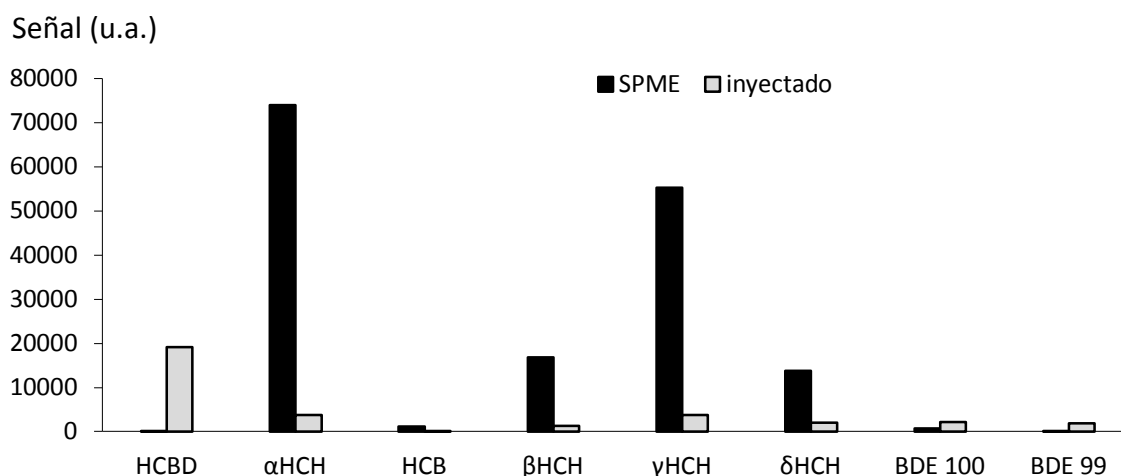


Figura 51. SPME frente a inyección directa

Las recuperaciones obtenidas para este último procedimiento, utilizando ACN en la extracción y preconcentración con SPME, eran desde 55-130%, siendo las más aceptables de los diferentes procedimientos propuestos. Además, este procedimiento ofrecía elevada sensibilidad para todos los analitos.

4.2.1.2 Parámetros analíticos

En las condiciones descritas en el procedimiento 3, con el empleo de acetonitrilo en la extracción y preconcentración previa al análisis, se determinaron los parámetros analíticos del método (Tabla 22). El método propuesto ofrece un intervalo de trabajo de 0.03-1.2 $\mu\text{g/L}$ (r^2 entre 0.9790-0.9994) y límites de detección entre 0.3 y 7.1 $\mu\text{g/Kg}$ como peso húmedo, menores a los valores legislados para hexaclorobenceno y hexaclorobutadieno.

Tabla 22. *Parámetros analíticos obtenidos para OCPs y BDEs*

Compuesto	LD mejillón ($\mu\text{g/Kg}$)	LD tellina ($\mu\text{g/Kg}$)	RSD (%) (n=3)	Recuperación (%)
Hexaclorobutadieno	0.3	0.2	10	55 \pm 10
Hexaclorobenceno	0.5	0.4	9	78 \pm 19
Pentaclorobenceno	0.3	0.2	5	116 \pm 21
α -Hexaclorociclohexano	3.7	2.8	5	114 \pm 29
β -Hexaclorociclohexano	4.7	3.6	1	74 \pm 8
γ -Hexaclorociclohexano	3.0	2	1	74 \pm 40
δ -Hexaclorociclohexano	4.7	3.6	5	130 \pm 30
BDE 47	3.0	2	23	75 \pm 25
BDE 99	4.6	3.5	19	60 \pm 23
BDE 100	7.1	5.3	5	109 \pm 70

RSD: desviación estándar relativa

4.2.1.3 Aplicación a muestras reales

El método propuesto fue aplicado a 17 muestras reales (11 mejillones y 6 tellinas), todas procesadas por duplicado. Para validar la exactitud del método se fortificaron muestras reales que no presentaban contaminación, siendo las recuperaciones las señaladas en la Tabla 22.

En la Figura 52 se puede ver el cromatograma obtenido para una muestra fortificada (30 ng/L) frente a un blanco. Entre las muestras analizadas únicamente fue detectado hexaclorobenceno en tres muestras de mejillón a concentraciones de 2.2 \pm 0.2, 2.9 \pm 0.3 y 1.8 \pm 0.2 $\mu\text{g/Kg}$.

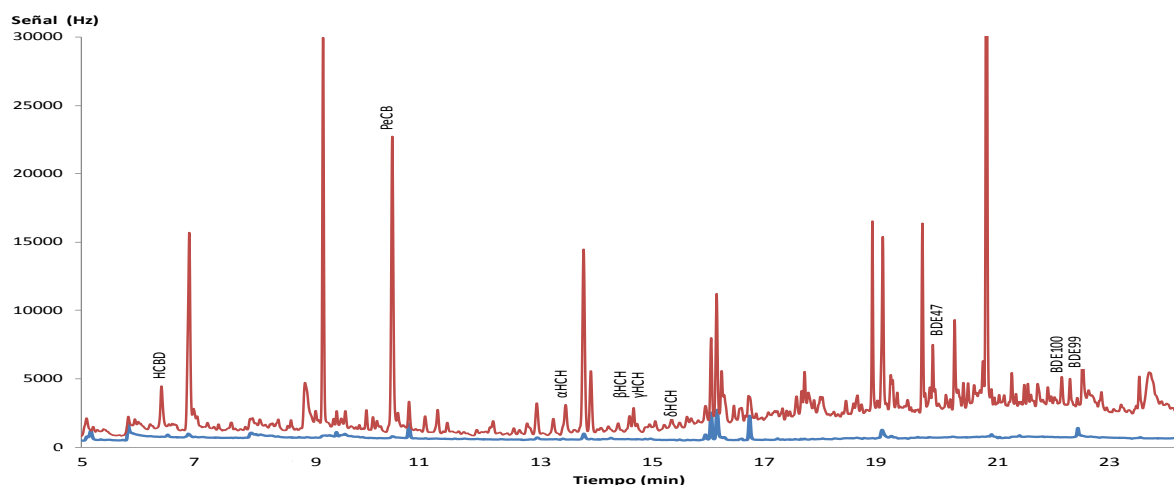


Figura 52. Cromatogramas de muestra fortificada (30 µg/L) y blanco

4.2.1.4 Conclusiones

El método de miniaturización propuesto es aplicable a la extracción y el análisis simultáneo de compuestos organoclorados y polibromo-difenil-éteres en muestras de bivalvos. La combinación de C₁₈ y Florisil® en la extracción de lípidos combinados con SPME y cromatografía de gases ofrece numerosas ventajas frente a otros métodos de análisis para estos compuestos, como la reducción del tiempo de análisis y las cantidades de reactivos empleadas.

En la Tabla 23 podemos ver una comparativa entre el método propuesto en este apartado y métodos empleados por otros autores para la determinación de estos compuestos en muestras de biota.

Tabla 23. Comparación entre métodos para el análisis OCPs y BDEs en biota

	Martínez et al. (2005) (PBDEs y PCBs)	Long et al. (1991) _{a,b} (OCPs)	Este trabajo (OCPs and PBDEs)
Cantidad de muestra	0.5	0.5	0.1
Sorbente (g)	1.5 g Florisil®	2 g C ₁₈	0.4 g C ₁₈
Pretratamiento	5 g sílica gel acidificada 2 g sílica gel neutral	2g Florisil®	-
Disolvente (mL)	n-Hexano (20 mL) n-Hexano (20 mL) n-Hexano-diclorometano (80:20), 12 mL	Acetonitrilo (8 mL)	Acetonitrilo (1.3 mL)
Preconcentración	-	-	SPME
Recuperaciones	> 75%	85±3 – 102±5	65±11-103±8

4.2.2 DETERMINACIÓN DE CLOROALCANOS (C10-13)

Para la determinación de SCCP de muestras de biota, como técnica de extracción fue empleada la extracción con microondas (MAE). Como técnica de preconcentración de los analitos fue utilizada la SPME, para la que fue necesario un estudio previo de diferentes disolventes miscibles en agua para la reconstitución de los analitos. Además, la miniaturización de la muestra fue ensayada con el fin de reducir el coste del análisis y la cantidad de muestra necesaria. A la vista de los resultados no favorables obtenidos con el sistema GC-MS en la determinación de SCCP en muestras acuosas (Punto 4.1.2), la separación y detección de los analitos fue llevada a cabo con un sistema GC- μ ECD.

4.2.2.1 Optimización del proceso

El primer paso en la optimización, basado en los procedimientos seguidos por otros autores (Parera et al. 2004), fue un estudio de comparación entre la inyección directa de la muestra y la preconcentración de ésta mediante microextracción en fase sólida. Puesto que no existe un patrón de referencia certificado comercial, se tomaron 0.5 g de muestra liofilizada, una muestra libre del analito fue fortificada con 147.5 μ g/g y extraída con MAE en las condiciones utilizadas por Parera et al. (2004), empleando como solvente una mezcla de hexano: acetona (1:1 v/v).

Por un lado, se tomaron 5 μ L del sobrenadante que fueron directamente inyectados en el sistema cromatográfico. Por otro lado, el sobrenadante era trasvasado a un vial de 2 mL y evaporado a sequedad con una corriente de nitrógeno, que posteriormente sería reconstituido en una mezcla agua: acetona (2:1), y preconcentrada por SPME.

Para la preconcentración con SPME dos polímeros fueron estudiados, PDMS y PDMS-DVB. Entre los polímeros empleados, al igual que se observó en el análisis en medio acuoso, PDMS-DVB fue el que mejores resultados ofrecía. La señal obtenida por éste era mayor por lo que se fijó este tipo de polímero para todo el proceso de optimización.

Al inyectar directamente la muestra al sistema cromatográfico se observaba una línea base con mucho ruido de fondo, debido a que en el proceso de extracción muchos compuestos presentes en la matriz son co-extraídos junto a los analitos de interés, por lo que al inyectar la muestra estos analitos se verían reflejados en el cromatograma obtenido (Figura 53).

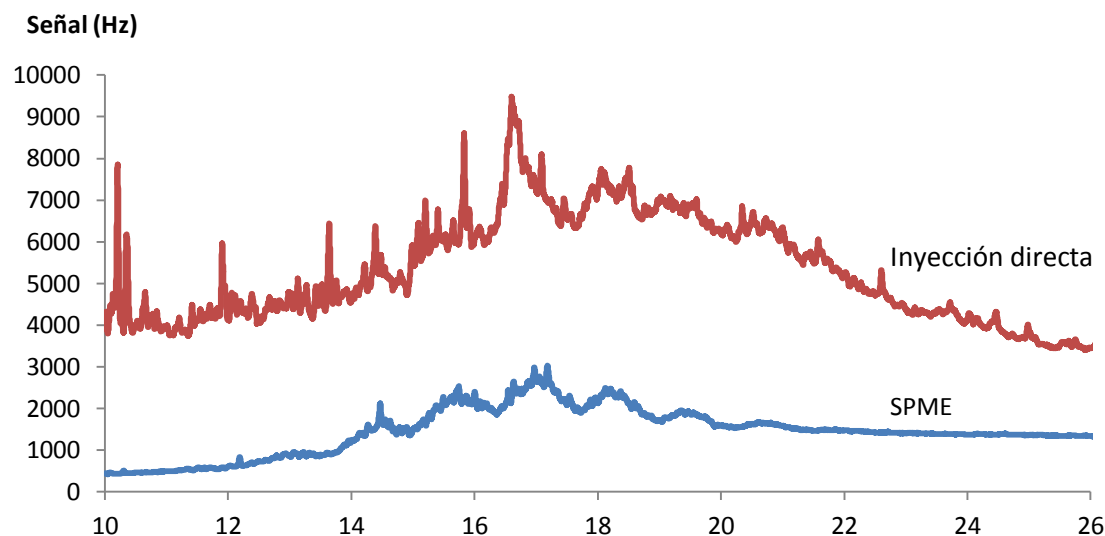


Figura 53. Cromatogramas obtenidos con inyección directa y con SPME para SCCP en muestras de biota.

Los extractos eran trasvasados a viales de 2 mL, concentrados bajo una corriente de nitrógeno y reconstituidos en diferentes mezclas de agua y acetona. El medio acuoso era empleado para mejorar la extracción SPME y debido a la miscibilidad que presenta la acetona tanto con agua como con hexano, ésta se empleó para favorecer la disolución de los analitos retenidos en los posibles restos de hexano. Las proporciones ensayadas fueron 1:1, 1:2 y 2:1 (v/v) para un volumen final de 1.5 mL. Entre ellos, la mezcla 2:1 (v/v) fue la que ofrecía un línea base más limpia.

La miniaturización y la agitación de la muestra fueron otros de los parámetros estudiados. Como ya se ha comentado anteriormente la agitación es un factor importante en la SPME. Para el estudio de la agitación, el sobrenadante de los extractos fue reconstituido en 1.5 mL de agua: acetona (2:1, v/v), y esta disolución fue extraída con SPME durante 30 minutos con agitación constante utilizando una barra magnética de 6mm x 3mm. Además, se ensayó la extracción en las mismas condiciones pero en ausencia de la barra magnética. Por otro lado, el sobrenadante de los extractos fue reconstituido en un inserto de vidrio de 400 μ L, hasta un volumen de 300 μ L de agua: acetona (2:1, v/v), la muestra fue extraída con SPME durante 30 minutos en ausencia de agitación. Como era de esperar, la agitación de la muestra favorecía el proceso de adsorción de los analitos sobre la fibra.

En cuanto a la miniaturización, ésta proporcionaba una mayor señal pero con recuperaciones menores que las obtenidas para 1.5 mL y con agitación constante. Por lo que se trabajó reconstituyendo la muestra en volúmenes de 1.5 mL de agua: acetona (2:1 v/v) y agitación constante.

El hexano y la acetona, empleados en el proceso de extracción, debido a sus propiedades químicas favorecen la co-extracción de otros compuestos orgánicos que pueden interferir en la determinación de cloroalcanos (C10-13). Se consideró aplicar un paso de pretratamiento de la muestra con Florisil® para eliminar las posibles interferencias. Tras la extracción con microondas, el sobrenadante se hizo pasar por un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) que contenía 0.1 g de Florisil®. Otros autores habían aplicado un paso de limpieza en publicaciones anteriores con resultados favorables (Zencat et al., 2004; Reth et al., 2005). Sin embargo, en este estudio se pudo observar que al aplicar Florisil®, tanto para la muestra inyectada como para la muestra preconcentrada con SPME, no se obtenía señal cromatográfica. Esto puede ser debido a que el Florisil®, al ser un adsorbente, retiene la fase lipídica junto a los analitos presente en los extractos.

Finalmente, el tiempo de inmersión de la fibra dentro de la disolución fue estudiado. Se ensayaron tiempos de extracción de 15, 30, 45 y 60 minutos. Como se puede observar en la Figura 54. La extracción a 15 y 30 minutos ofrecía resultados similares, siendo ligeramente superior la señal obtenida a 30 minutos. A 45 minutos la cantidad extraída aumentaba considerablemente, en cambio, al extraer durante 60 minutos la señal observada disminuía ligeramente. Con todo esto, el tiempo fijado para la extracción de las muestras fue de 45 minutos.

En el método optimizado para el análisis de cloroalcanos en muestras acuosas, se observó que el detector de captura de electrones era más sensible para estos compuestos. Por tanto, considerando estos resultados, el análisis de muestras de biota fue realizado en el sistema GC- μ ECD para mejorar la sensibilidad.

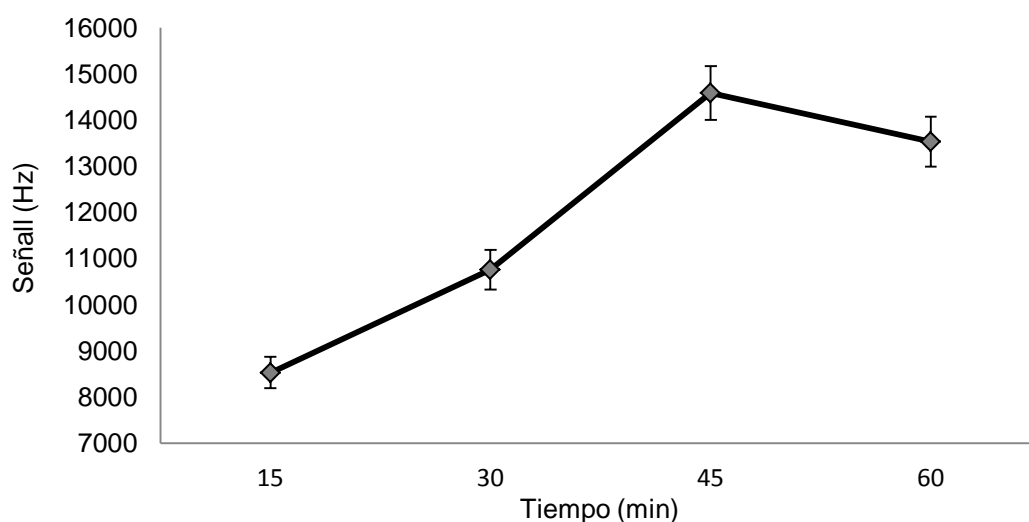


Figura 54. Influencia del tiempo de extracción

El método optimizado está basado en el empleo de una mezcla hexano: acetona (2:1, v/v) para la extracción de parafinas mediante microondas. La muestra era centrifugada y el sobrenadante era trasvasado a un vial de 2 mL, donde el disolvente era evaporado a sequedad con una corriente de nitrógeno. Los analitos se reconstituían en 0.5 mL de acetona y a continuación se añadía 1 mL de agua MilliQ, y una barra magnética. Los analitos eran preconcentrados por SMPE con la fibra sumergida en la disolución durante 45 minutos con agitación constante, y analizados por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones.

4.2.2.2 Parámetros analíticos

Debido a la ausencia de una muestra de referencia certificada, para la determinación de los parámetros analíticos se tomaron muestras blancas de cada ejemplar, que fueron incentivadas a distintas concentraciones de cloroalcanos. Los límites de detección y cuantificación fueron determinados en peso seco como la menor concentración que generaba una señal igual a tres y diez veces el ruido de fondo de la muestra blanco. Estos valores fueron calculados como valor en peso húmedo considerando el porcentaje acuoso de estos organismos, obteniendo un límite de detección para mejillón de 10.6 ng/g y de 8 ng/g para tellina y la recuperación final que ofrece este método es del 86%. El intervalo dinámico lineal fue estudiado analizando la muestra fortificada a diferentes concentraciones desde 24 ng/g hasta 10.88 µg/g ($r^2=0.9865$). La precisión para un patrón de 5.44 µg/g calculada como desviación estándar relativa (RSD) para replicas en un mismo día es 7% (n=3) y RSD entre días es de 11% (n=3).

4.2.2.3 Aplicación a muestras reales

El método desarrollado fue aplicado a 7 muestras de mejillón y 6 muestras de tellina, de las cuales solo dos (1 mejillón y 1 tellina) no estaban contaminadas por SCCP. Las concentraciones detectadas en mejillón estaban entre límite de detección (3 muestras) y 3500 ± 200 ng/g (peso húmedo). En tellinas, de las 6 muestras analizadas 3 estaban al nivel del límite de detección, otras tres fueron cuantificadas hasta concentraciones de 935 ± 95 ng/g (peso húmedo).

Diferentes estudios han determinado la presencia de estas sustancias en organismos acuáticos. Borgen et al. (2003) observó en mejillón concentraciones entre 14-130 ng/g (peso húmedo), en otros organismos como trucha fueron detectadas hasta concentraciones de 5.33 µg/g (Bayen et al., 2006)

4.2.2.4 Conclusiones

El método propuesto se basa en el empleo de microextracción en fase sólida para la determinación de cloroalcanos (C10-13) en muestras de biota, previa extracción con

microondas. Permite la determinación de SCCP minimizando las interferencias, y con buena sensibilidad, robustez y recuperaciones del 86%. Al sustituir la extracción en fase sólida por SPME, el tiempo de preparación de la muestra se ve reducido. Como pretratamiento de la muestra, a diferencia de otros autores, en este trabajo se ha observado que el empleo de Florisil® no favorece la extracción de la muestra.

En la Tabla 24 se puede ver una comparativa entre los métodos empleados por otros autores y el método desarrollado en este trabajo. Los límites de detección que ofrece este método son del orden de otros procedimientos, y al no ser necesario el pretratamiento de la muestra el tiempo de análisis se ve reducido considerablemente.

Tabla 24. Comparación entre métodos de análisis de SCCPs en biota

Muestra	Extracción		Pretratamiento	Separación/ Técnica de detección	LD (ng/g)	Ref.
	Disolvente	técnica				
Pescado	Pentano: acetona (2:1)	Extracción en frío	Na ₂ SO ₄ /sílica	GC-ECNI	nd	Beaume et al., 2006
Pescado	Hexano:DCM	Elución en columna	sílice	GC-ECNI-MS	1.5 ng	Zencak et al, 2005
Pescado	Hexano:DCM	Elución en columna	Florisil®	GC-ECNI	500-1000	Reth et al., 2005
Mamíferos	Hexano: acetona Dietileter: hexano	Elución en columna	Fotólisis	GC-ECD	20	Fridén et al., 2004
Pescado	Hexano:DCM	Elución en columna	Florisil®	EI-MS-MS	100-4000	Zencak et al., 2004
Pescado	Hexano: acetona (1:1)	Shoxlet	H ₂ SO ₄ / sílica gel/GPC	GC-ECNI-MS	10-100 pg	Coelhan et al., 1999
Pescado/ mejillón	nd	Extracción en frío	H ₂ SO ₄ /GPC	GC-ECNI-MS	nd	Borgen et al., 2003
Beluga	Hexano	Extracción en caliente	Florisil®	GC-ECNI-MS	110-1360	Tomy et al., 2000
Pescado	Tolueno	Elución en columna	GPC/ Florisil®	GC-ECD	1 ng/g	Fisk et al., 1998
Mejillón/tellina	Hexano: acetona (1:1)	MAE	-	GC-μECD	8 - 10.6	Este trabajo

nd. No disponible

4.2.3 DETERMINACIÓN DE ORGANOESTÁNNICOS

En este apartado se estudiaron diferentes procedimientos para la extracción de compuestos organoestánnicos en muestras de biota. Los compuestos en los que se centra este estudio fueron: monobutilo de estaño (MBT), dibutilio de estaño (DBT), tributilo de estaño (TBT). En este trabajo se ensayaron diferentes modos de extracción empleando técnicas como microondas y ultrasonidos, mediante diferentes procedimientos, combinadas con SPME como técnica de preconcentración. La determinación de estos compuestos se llevó a cabo mediante separación cromatográfica acoplada a un detector de espectrometría de masas. Como se ha podido observar en el estudio aplicado a muestras acuosas, es el detector que mayor sensibilidad ofrece ante estos compuestos.

4.2.3.1 Optimización del método

Se desarrollaron diferentes procedimientos para lograr las mayores recuperaciones de los compuestos en muestras de biota, mediante la variación de las condiciones utilizadas para la extracción con MAE y USE, y la combinación con diferentes soportes sólidos para la retención de lípidos. Todos los parámetros de este método fueron optimizados utilizando patrones y una muestra de referencia certificada, CRM 477, que contenía MBT, DBT y TBT a 2200 ± 190 , 1540 ± 120 y 1500 ± 280 ng/g, respectivamente.

Procedimiento con MAE: se utilizaba como técnica de extracción el horno microondas a 250W durante 30 minutos a diferentes temperaturas: 42°C, 75°C, 100°C y 125°C, empleando como disolvente una mezcla de ácido acético: metanol (3:1). Los extractos eran centrifugados y 500 μ L del sobrenadante eran trasvasaron a un vial de 5 mL, donde eran procesados. La derivatización se llevaba a cabo añadiendo 1.5 mL de disolución tampón ácido acético: acetato de sodio (2M) y 0.05 mL de reactivo derivatizante (STEB, 2%). Los analitos eran preconcentrados con SPME, utilizando para ello una fibra de PDMS y muestreando en el espaciado de cabeza.

Como se muestra en la Figura 55 a 42°C se obtenían las mejores extracciones para MBT y TBT, siendo ligeramente superiores a 125°C para DBT, por consiguiente, las condiciones para MAE se fijaron a 42°C. Posteriormente, se estudiaron los tiempos de extracción en MAE a 10, 15 y 30 minutos siendo éste último el que mejores extracciones ofrecía.

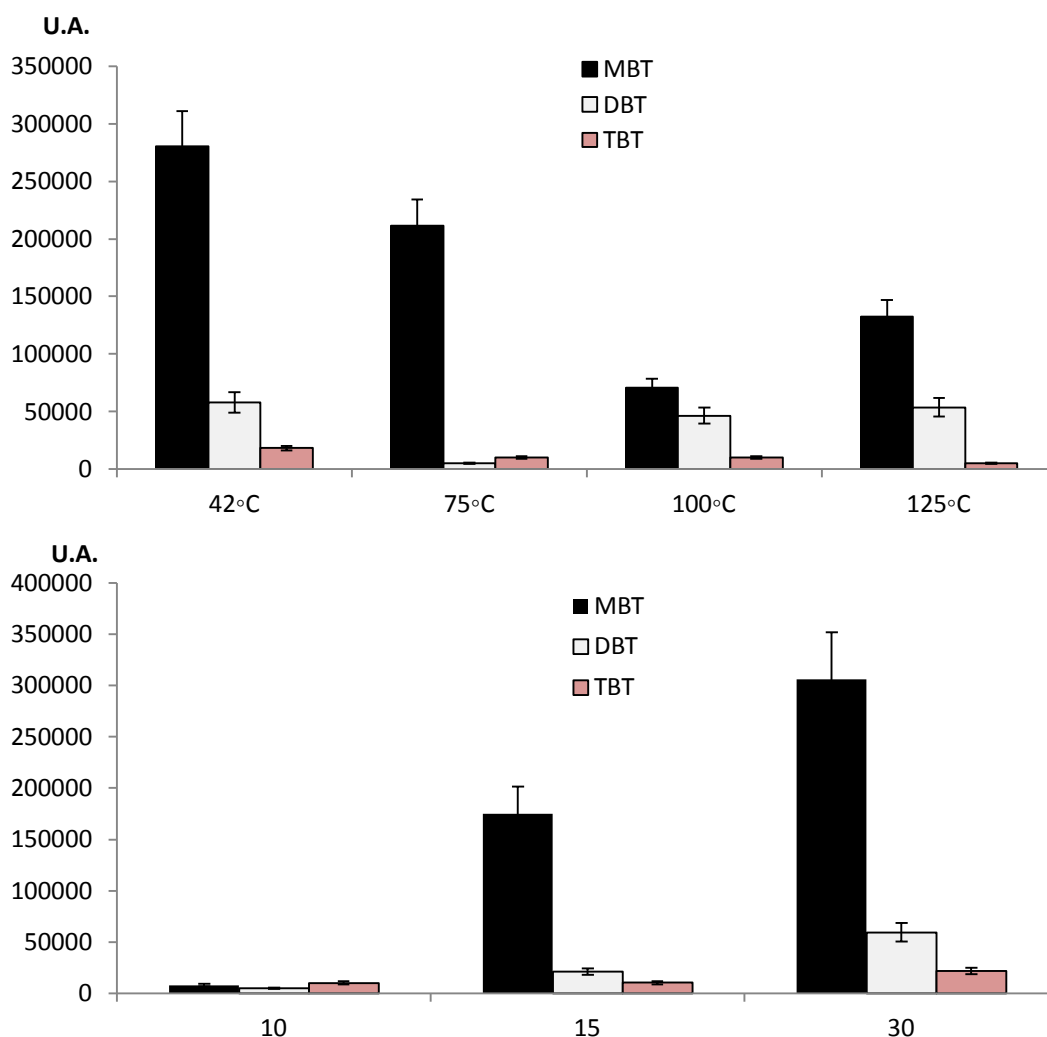


Figura 55. Temperaturas y tiempos estudiados en MAE

Puesto que el proceso de extracción de los analitos mediante SPME es independiente del proceso previo de extracción de la matriz, el tiempo de extracción con SPME se estudió para el primer procedimiento de extracción de la matriz 30, 33, 45 y 60 minutos. Como se puede observar en la Figura 56 el tiempo de extracción óptimo era 45 minutos, especialmente para DBT.

Por otra parte, se procesaron las muestras en disoluciones tampón, en medio acuoso, metanólico y en ausencia de tampón. Como ya se ha comentado en el punto 4.3.1 la derivatización de los compuestos de estaño se ve favorecida a pH ligeramente ácidos. Sin embargo, en la extracción de estos compuestos de la matriz de biota ésta se veía favorecida en ausencia de tampón. En la Figura 57 se puede observar que el tampón metanólico no ofrecía elevadas recuperaciones, debido a que estos compuestos son sensibles al metanol pudiendo degradarse en determinadas condiciones. El tampón acuoso ofrecía mejores resultados no

siendo muy diferentes de los obtenidos en ausencia de este, por esto se optó por trabajar sin adicionar tampón y de este modo reducir el tratamiento de la muestra.

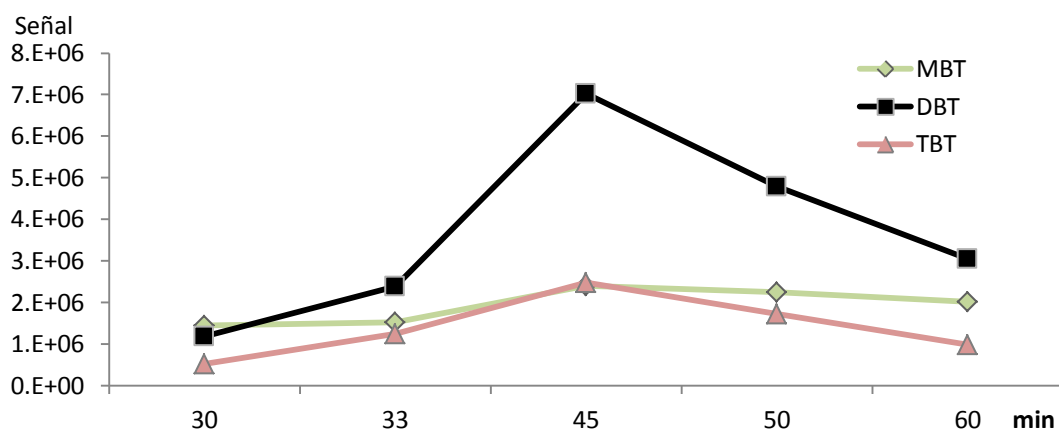


Figura 56. Influencia del tiempo de extracción para SPME

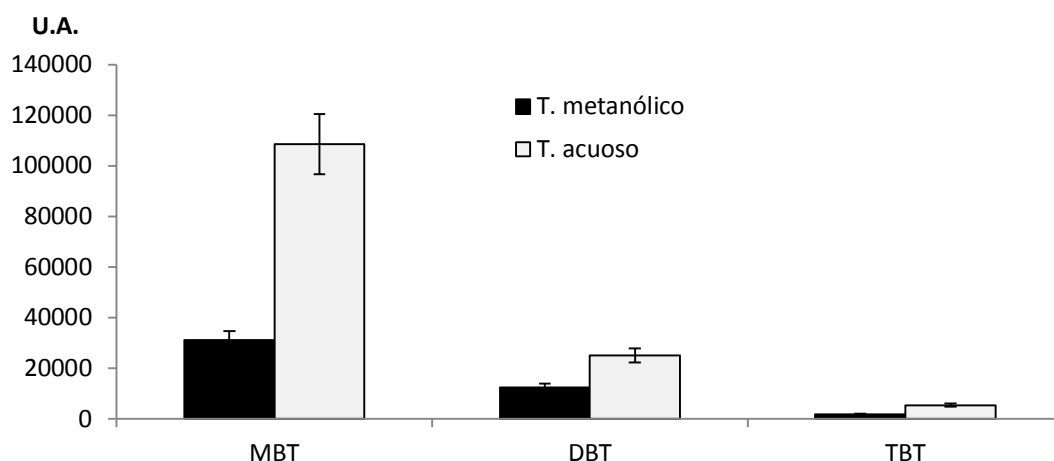


Figura 57. Influencia del tampón en el proceso de extracción

Procedimiento en USE: las muestras eran procesadas utilizando ultrasonidos a 42°C durante 60 minutos. Para este procedimiento, y en base a la bibliografía estudiada, se ensayaron diferentes disolventes en la extracción: etanol, acetonitrilo, ácido acético, metanol y ácido clorhídrico. En la Figura 58 se muestran los resultados obtenidos de este estudio, siendo el ácido acético el que mejores resultados ofrecía en la extracción de los compuestos de estaño, especialmente para el DBT. El resto de disolventes muestran resultados similares, favoreciendo la extracción de MBT frente a DBT o TBT.

Posteriormente, los extractos eran centrifugados durante 5 minutos a 7500 rpm, 500 µL del sobrenadante eran trasvasados a un vial de 5 mL donde eran tratados como se indica en el procedimiento 1, y extraídos con SPME durante 45 minutos.

En general la recuperación obtenida de la extracción con USE era mayor que la obtenida con MAE, por lo que las muestras fueron extraídas en el sistema de ultrasonidos con ácido acético como disolvente.

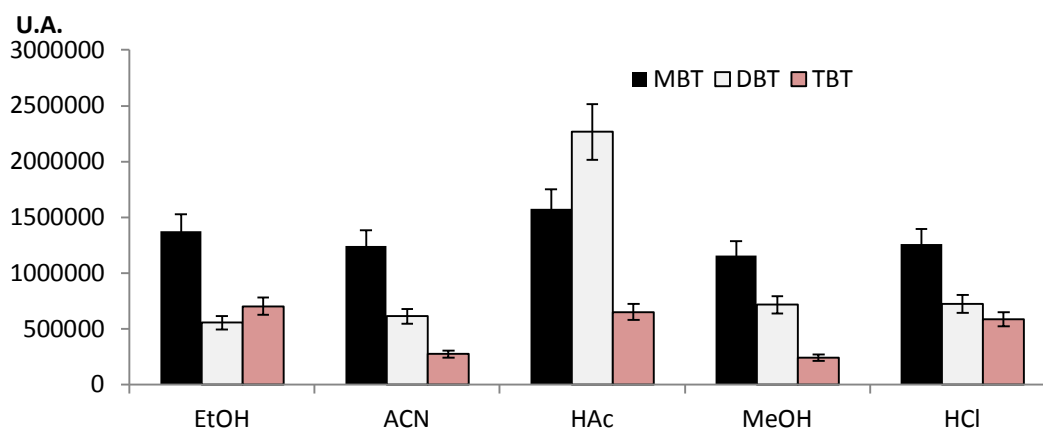


Figura 58. Influencia de los disolventes de extracción

Finalmente, en base a los resultados obtenidos de los procedimientos descritos previamente, la muestra era depositada en un vial de 22 mL junto con 4.25 mL de ácido acético, y procesada utilizando un baño de ultrasonidos durante 60 minutos. Posteriormente, era centrifugada a 5000 rcf durante 5 minutos y del sobrenadante se tomaban 4 mL, a los cuales se les adicionaba 9.7 mL de agua MilliQ y 0.3 mL de derivatizante (STEB). Los analitos eran preconcentrados durante 45 minutos con SPME.

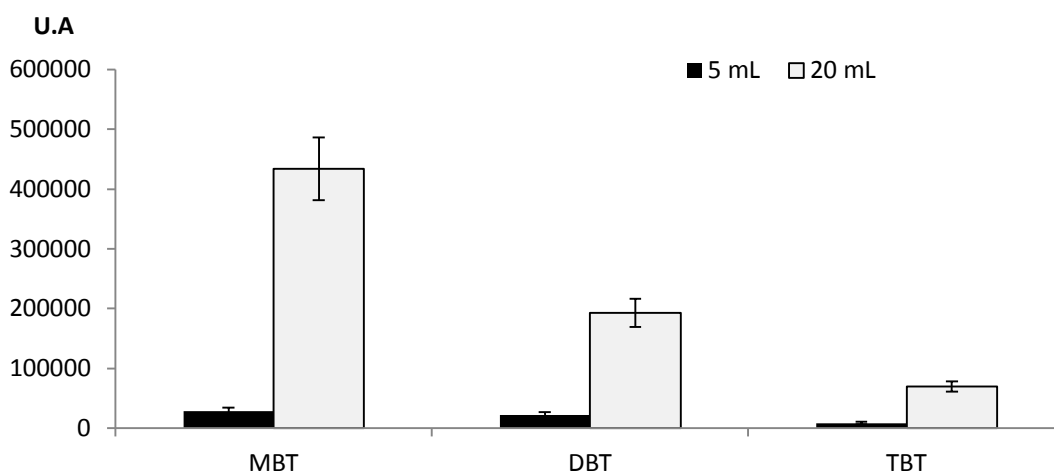


Figura 59. Efecto de miniaturización

En la Figura 59 se muestra los resultados obtenidos en este estudio. Como cabría esperar, la señal ofrecida por la muestra miniaturizada era menor que la señal obtenida por la

muestra a mayor volumen, siendo esta diferencia considerable. Por consiguiente, se trabajó con todas las muestras en viales de 22 mL y con las cantidades proporcionales de reactivos.

4.2.3.2 Parámetros analíticos

Se realizó un primer estudio en modo full scan, desde 100 a 400 m/z, para determinar los iones característicos de los compuestos y su abundancia relativa. Posteriormente, se procedió al análisis en modo SIM. La Tabla 25 muestra los iones de cuantificación y característicos para cada compuesto.

Tabla 25. *Iones característicos de los TBT, DBT y MBT*

Compuesto	Ion de cuantificación	Iones característicos
MBT	235	151
		179
DBT	263	151
		179
TBT	291	121
		151
		179
		207
		235
		263

El modo SIM fue utilizado para la determinación de los parámetros analíticos del método propuesto. Los límites de detección que ofrece este método están entre 0.005 y 0.008 µg/g, los coeficientes de determinación son mayores de 0.99 para MBT y TBT, de 0.96 para DBT. Los valores de desviación estándar (RSD) eran igual o menores a 20% y recuperaciones entre 72% y 98%.

4.2.3.3 Aplicación a muestras reales

La validación del método se determinó sobre un patrón de referencia certificado, CRM 477. Además, se analizaron diferentes muestras reales, tanto de mejillón como de tellina.

Entre las muestras analizadas se detectó TBT en ambos organismos en concentraciones desde el límite de detección hasta 0.64 µg/g, siendo estas concentraciones, en general, mayores en las muestras de mejillón que en las de tellinas.

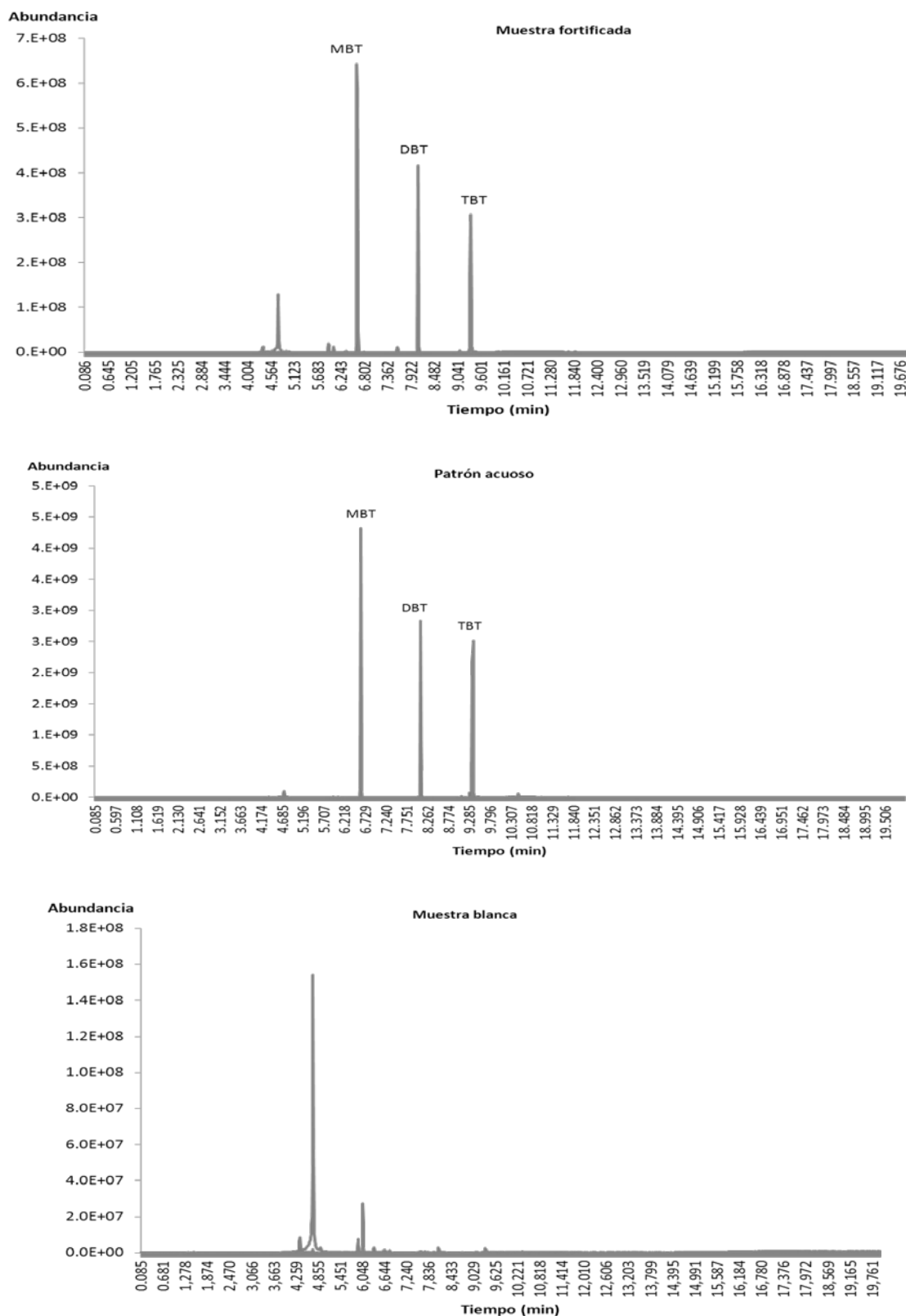


Figura 60. Cromatogramas obtenidos en modo SIM para MBT, DBT y TBT en patrón acuoso, muestra blanca y muestra fortificada

4.2.3.4 Conclusiones

De los diferentes procedimientos estudiados, las condiciones más favorables para la extracción de los compuestos organoestánicos de muestras de biota son las descritas en el procedimiento de USE. La muestra es tratada en baño de ultrasonidos durante 60 minutos, empleando ácido acético como solvente y posteriormente los analitos son preconcentrados con SPME, utilizando fibra de PDMS durante 45 minutos. El método propuesto ofrece bajos límites de detección, además de elevada reproducibilidad y repetibilidad. En la Tabla 26 se muestra una comparativa bibliográfica sobre métodos de extracción y análisis de organoestánicos en muestras de estos organismos. Los límites de detección que ofrece el método propuesto son menores que los publicados por otros autores.

Tabla 26. Comparación entre métodos de análisis de organoestánicos en biota.

Compuesto	muestra	LD (ng/g)	Pretratamiento	Técnica	Reactivo Derivantizante	masa de muestra (g)	referencia
TBT	mejillón	377	USAE	GC-MS	R. Grignard	0,5	Licio et al., 2008
	mejillón	25	USAE	GC-MS	STEB	0,5	Licio et al., 2008
	mejillón		SPE	LPGC-MS/MS	R. Grignard		Vidal et al, 2003
	mejillón	0,008	USAE	GC-MS	STEB	1	Este trabajo
	tellina	0,036	USAE	GC-MS	STEB	1	Este trabajo
MBT	mejillón	99	USAE	GC-MS	R. Grignard	0,5	Licio et al., 2008
	mejillón	19	USAE	GC-MS	STEB	0,5	Licio et al., 2008
	mejillón		SPE	LPGC-MS/MS	R. Grignard		Vidal et al, 2003
	mejillón		USAE	GC-MS	STEB	1	Este trabajo
	tellina		USAE	GC-MS	STEB	1	Este trabajo
DBT	mejillón	148	USAE	GC-MS	R. Grignard	0,5	Licio et al., 2008
	mejillón	13	USAE	GC-MS	STEB	0,5	Licio et al., 2008
	Mejillón		SPE	LPGC-MS/MS	R. Grignard		Vidal et al, 2003
	Mejillón		USAE	GC-MS	STEB	1	Este trabajo
	Tellina		USAE	GC-MS	STEB	1	Este trabajo

STEB: tetraetilborato de sodio; STPB: tetrapropilborato de sodio.

4.3 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

Entre los marcadores de la contaminación ambiental se encuentran los sedimentos. Su empleo para determinar la calidad de una zona se debe en gran medida a la poca movilidad que presentan, sólo las capas más superficiales son desplazadas por las corrientes de agua. Al estar permanentemente en contacto con la fase acuosa, existe la posibilidad de que los contaminantes queden asociados a la materia particulada del sedimento. Esto no sólo repercute en la bioacumulación en los organismos que están en contacto con este sedimento, si no que además, debido a los equilibrios que se producen en la interfase sedimento-agua, los contaminantes retenidos pueden llegar a pasar a la fase acuosa, pudiendo ser estos sedimentos una fuente de contaminación futura.

Para el desarrollo de este trabajo fueron analizados sedimentos marinos tomados del litoral de la Comunidad Valenciana. Todas las muestras eran liofilizadas y conservadas hasta su análisis.

4.3.1 DETERMINACIÓN DE ORGANOHALOGENADOS

Como ya se ha comentado anteriormente, entre los compuestos organoclorados se seleccionaron compuestos con capacidad para adherirse a la materia particulada, por ello en este apartado los compuestos de estudio fueron: hexaclorobutadieno (HCBD), isómeros del hexaclorociclohexano (α HCH, β HCH, γ HCH y δ HCH), hexaclorobenceno (HCB), pentaclorobenceno (PeCB) y polibromo-difenil-éteres (PDBE). Para poder determinar estos compuestos en el sedimento, diferentes procedimientos fueron estudiados. Los métodos de extracción ensayados fueron la extracción con ultrasonidos, ya que muchos autores la utilizan para la extracción de compuestos organoclorados (OCPs) en esta matriz, y la dispersión de la matriz en fase sólida, debido a los resultados favorables obtenidos en la extracción de OCPs en muestras de biota.

A partir de los resultados obtenidos en los métodos previamente descritos en este trabajo de tesis, como técnica de preconcentración fue empleada SPME y para el análisis de las muestras un sistema de cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones.

4.3.1.1 Optimización del método

- *Extracción MSPD*

El primer estudio fue la selección del solvente para la elución de los analitos, en base a las referencias bibliográficas se consideraron: hexano, acetona y acetonitrilo. En la Figura 61 se puede ver un gráfico con las recuperaciones obtenidas para todos los analitos con los diferentes disolventes estudiados. Las recuperaciones obtenidas al extraer con acetona estaban entre 9% y

35%, además muchos compuestos eran co-extraídos afectando a la línea base. El hexano permitía extraer los analitos con recuperaciones ligeramente superiores (11-62%). En general, las mejores recuperaciones eran conseguidas al extraer los analitos con acetonitrilo, aunque estas recuperaciones no eran muy elevadas, salvo para PeCB, β HCH, α HCH y δ HCH que eran superiores al 65%.

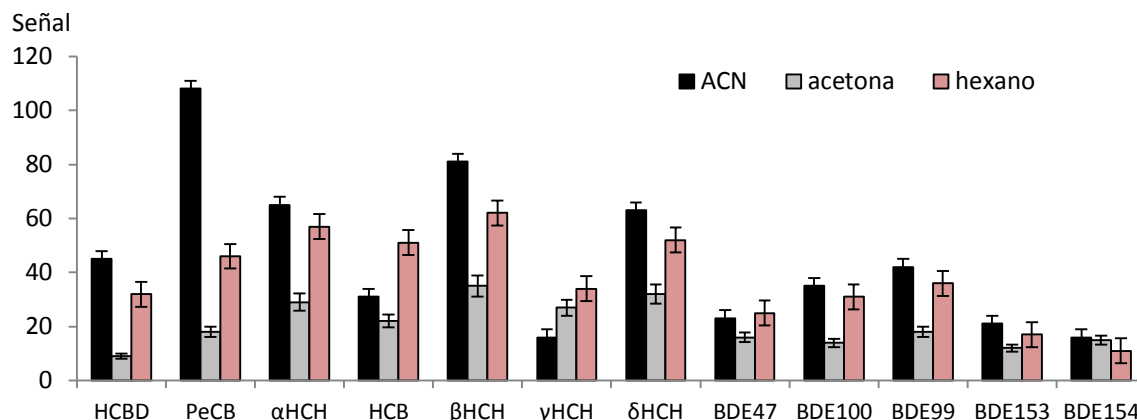


Figura 61. Recuperaciones obtenidas para los disolventes ensayados en la extracción con MSPD

- *Extracción con USE*

A la vista de los resultados obtenidos con la MSPD y puesto que las recuperaciones no eran favorables con los solventes utilizados, se consideró la extracción empleado ultrasonidos. Ésta fue llevada a cabo tomando 2 g de muestra liofilizada y utilizando como solvente acetonitrilo, ya que era el disolvente que mayores recuperaciones proporcionaba para MSPD.

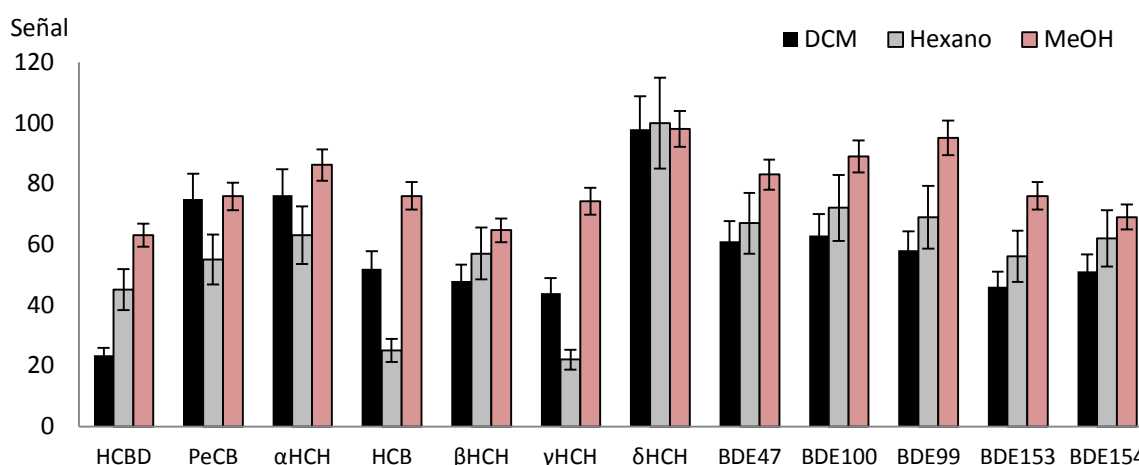


Figura 62. Recuperaciones obtenidas para algunos disolventes ensayados en la extracción con USE.

Debido a que las recuperaciones con USE y acetonitrilo eran 7-37%, se ensayaron otros disolventes como diclorometano, metanol, hexano y acetona. La extracción con acetona proporcionaba cromatogramas muy contraminados debido a otros compuestos co-extraídos, y las recuperaciones no eran muy elevadas (8-29%). Entre los otros disolventes ensayados, como se puede observar en la Figura 62 las recuperaciones más elevadas eran logradas con metanol (63-98%), salvo para δ HCH que se veía ligeramente favorecido en la extracción con hexano.

El siguiente estudio realizado fue el modo de inyección de la muestra, la inyección directa de presentaba una línea base con elevada, lo que dificultaba el análisis. En cambio, la preconcentración de los analitos ofrecía cromatogramas con menos ruido de fondo, por tanto todos los ensayos se realizaron utilizando SPME con fibra de PDMS-DVB (65 μ m) como paso previo al análisis cromatográfico. El tiempo de extracción se estudió con muestras fortificadas con todos los analitos, para ello, 2 g de muestra eran procesadas con USE durante 1 hora con 4 mL de metanol, los extractos eran centrifugados y 1 mL del sobrenadante era trasvasado a un vial de 4 mL, dónde eran adicionados 3 mL de agua MilliQ. Los analitos eran extraídos a diferentes tiempos con SPME y agitación constante utilizando una barra magnética (3 mm x 6 mm).

En la Figura 63 se puede observar la señal obtenida para los distintos tiempos de extracción estudiados, como se puede ver el tiempo óptimo de extracción es de 45 minutos para todos los analitos excepto hexaclorobenceno.

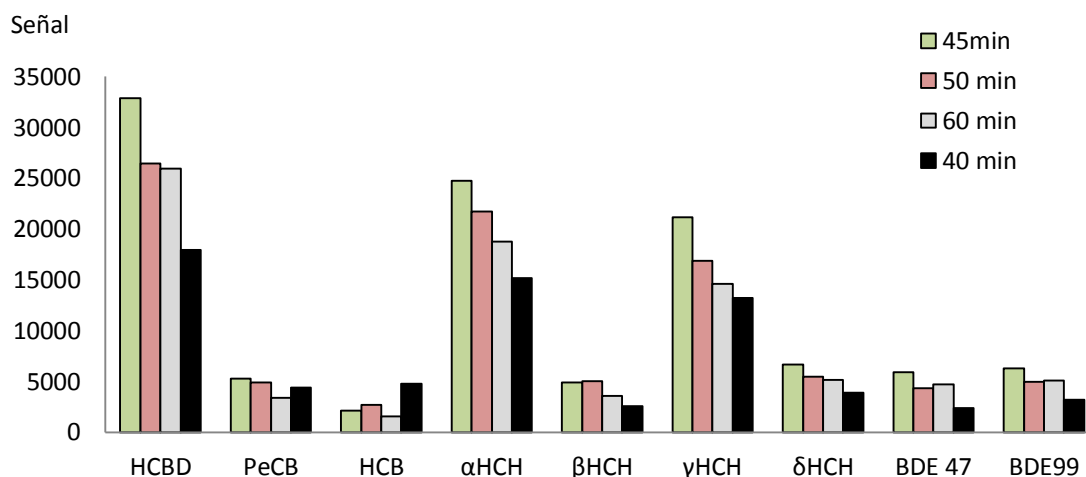


Figura 63. Influencia del tiempo de SPME

4.3.1.2 Parámetros analíticos

La combinación de ultrasonidos empleando como disolvente hexano con SPME y GC- μ ECD para la determinación de OCPs y PBDEs ofrece recuperaciones entre 61 y 98 %, además de

elevada sensibilidad, que permite detectar estos compuestos a concentraciones desde 0.5 µg/Kg para hexaclorobutadieno hasta 2.25 µg/Kg para PBDEs, y buena reproducibilidad (RSD 4-14%). En la Tabla 27 se indican los parámetros analíticos obtenidos por el método propuesto.

Tabla 27. *Parámetros analíticos obtenidos para OCPs y PBDEs*

compuesto	LD (µg/Kg)	LQ (µg/Kg)	RSD (%) (n=3)	Recuperación (%)
Hexaclorobutadieno	0.5	1.5	6	63 ± 9
Hexaclorobenceno	0.563	1.689	11	76 ± 13
Pentaclorobenceno	0.555	1.665	13	86 ± 16
α-Hexaclorociclohexano	0.585	1.755	9	76 ± 11
β-Hexaclorociclohexano	1.17	3.51	6	65 ± 8
γ-Hexaclorociclohexano	0.585	1.755	3	74 ± 7
δ-Hexaclorociclohexano	1.17	3.51	12	98 ± 13
BDE 47	1.54	4.62	8	83 ± 20
BDE 99	0.655	1.965	4	88 ± 15
BDE 100	0.873	2.619	6	79 ± 12
BDE153	2.25	6.75	11	61 ± 19
BDE 154	2.25	6.75	14	66 ± 24

4.3.1.3 Aplicación a muestras reales

El método desarrollado se aplicó a 24 muestras reales tomadas de la costa de la Comunidad Valenciana. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, una tercera réplica era incentivada a concentraciones conocidas de los analitos. Entre las muestras analizadas, todos los compuestos organoclorados (OCPs) fueron detectados al nivel del límite de detección en alguna de las muestras. Sólo hexaclorociclohexano y hexaclorobenceno fueron detectados por encima del límite de cuantificación, hexaclorociclohexano fue detectado en una muestra a la concentración de 8.4 ± 0.9 µg/Kg y hexaclorobutadieno fue detectado en cuatro muestras a concentraciones entre 1.3 - 35 µg/Kg. Los resultados son similares a los detectados por otros autores.

4.3.1.4 Conclusiones

El método propuesto, basado en la extracción con ultrasonidos, permite la extracción y el análisis de compuestos organoclorados y PBDEs. Las recuperaciones obtenidas son comparables con otros trabajos previamente publicados, minimizando las cantidades de muestra y reactivos empleadas. Además, es un método sencillo y no requiere largos tiempos para el procesado de las muestras.

En la Tabla 28 se puede ver la comparativa entre este trabajo y otros trabajos de análisis de compuestos organoclorados y polibromo-difenil-éteres en muestras de sedimentos.

Tabla 28. Comparación entre métodos de análisis de OCPs y PBDEs en sedimento

Compuesto	Cantidad de muestra	Pretratamiento		Extracción		Separación/ Técnica de detección	Recuperación	Ref.
		Reactivo	Técnica	Disolvente	Técnica			
OCPs	20 g	Florisil®	Elución en columna	Metanol: acetona (80 mL)	USE	GC-ECD	73-95%	Xue et al., 2005
OCPs	nd	-	GPC	Hexano: cloruro de metileno (300 mL)	Soxhlet	GC-ECD	nd	Miglioranza et al., 1999
PBDEs	5 g	Sílica	Elución en columna	Diclorometano: hexano (150 mL)	ASE	GC-ECI-MS	68.5-78.8%	Wang et al., 2009
OCPs	10 g	C ₁₈	Elución en columna	Acetona: hexano (150 mL)	Soxhlet	GC-ECI-MS	80%	Darko et al., 2008
OCPs/PBDEs	2 g	-	-	Metanol (4 mL)	USE	SPME-GC- μ ECD	63-98%	Este trabajo

nd. No disponible

ASE: extracción con solvente acelerado

4.3.2 DETERMINACIÓN DE CLOROALCANOS (C10-13)

En este apartado se estudiaron diferentes formas de extracción de los analitos, para su posterior preconcentración con SPME. La técnica de separación y detección fue un sistema de cromatografía de gases con detector de captura de electrones. Entre las técnicas de extracción ensayadas están: extracción asistida con microondas (MAE), la extracción con ultrasonidos (USE) y la extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

4.3.2.1 Optimización del método

La extracción de cloroalcanos (C10-13) en muestras de sedimento fue estudiada con tres técnicas diferentes: extracción con microondas (MAE), con ultrasonidos (USE) y por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

- *Extracción con MAE*

A la vista de los buenos resultados obtenidos previamente en la extracción de estas sustancias en muestras de biota, se consideró el uso de la extracción por microondas en muestras de sedimento. Las muestras se procesaron en base al método propuesto por Parera et al. (2004) y aplicando técnicas de miniaturización. Un gramo de muestra fortificada era extraída con 2 mL de una mezcla hexano: acetona (1:1). La programación del equipo microondas utilizado fue 100°C durante 15 minutos. Tras su extracción, la muestra era centrifugada y 1.5 mL del sobrenadante era trasvasado a un vial de 2 mL donde era reconstituida en 100 µL de hexano, de los cuales 5 µL eran inyectados directamente en el sistema cromatográfico. Las recuperaciones obtenidas con este procedimiento eran menores del 25%, menores de los valores esperados.

- *Extracción con USE*

Como alternativa a la extracción con microondas se ensayó la extracción con ultrasonidos. Diferentes solventes fueron testados, entre ellos la mezcla utilizada con MAE, además de una mezcla hexano: DCM (1:1), DCM o hexano fueron testados. Las recuperaciones obtenidas utilizando DCM eran las más elevadas (35%), pero siguiendo este procedimiento otros compuestos eran co-extraídos. La extracción con hexano ofrecía recuperaciones incluso ligeramente menores a las logradas con DCM (32%). En cualquier caso, las recuperaciones obtenidas al utilizar ultrasonidos no eran demasiado favorables.

- *Extracción con MSPD*

Con el fin de mejorar las recuperaciones obtenidas, se ensayó la extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida. El procedimiento seguido era similar al utilizado para la extracción de compuestos organoclorados en muestras de biota. Se tomaba 1 g de muestra de

sedimento liofilizado, que era homogenizada con C₁₈ y trasvasada a un cartucho de SPE (3 mL), a través del cual se hacían pasar 2 mL de eluyente. Considerando los resultados obtenidos tras el uso de Florisil® para la extracción en muestras de biota, la extracción fue estudiada principalmente en ausencia de éste, pero además se probó empleando 0.05, 0.1 y 0.2 g.

Para la selección del eluyente adecuado se trabajó con varias mezclas, hexano: acetona (1:1), hexano: diclorometano (1:1) y hexano. Todos estos ensayos se estudiaron en ausencia de Florisil®, e inyectando 5 µL de los extractos en el sistema GC-µECD. La línea base conseguida al extraer con hexano fue la más limpia, y por tanto este disolvente fue utilizado para el resto de ensayos.

La cantidad adecuada de Florisil® fue probada eluyendo los analitos con 2 mL de hexano. Por un lado, el hexano de los extractos era eliminado a sequedad con una corriente de nitrógeno y reconstituidos en 100 µL de hexano, de los cuales 5 µL eran inyectados en el sistema de GC-µECD. Por otro lado, eran reconstituidos en 1 mL de acetona, donde se añadieron 2 mL de agua MilliQ, y posteriormente se preconcentraron con SPME, utilizando fibras de PDMS-DVB durante 30 minutos con agitación constante. La Tabla 29 muestra las recuperaciones obtenidas para la inyección directa y la preconcentración con SPME utilizando las distintas cantidades de Florisil®. Tanto al inyectar la muestras directamente como al preconcentrar con SPME, las recuperaciones más favorables se obtenían con 0.05 g de Florisil®. En general, las recuperaciones obtenidas por inyección directa fueron ligeramente superiores que las conseguidas con SPME; sin embargo, la línea base obtenida al preconcentrar contenía menos interferentes.

Tabla 29. Recuperación obtenidas para diferentes cantidades de Florisil®

Cantidad Florisil® (g)	SPME (%)	Inyección directa (%)
Ausencia	87 ± 6	92 ± 12
0.05	93 ± 4	108 ± 10
0.1	71 ± 13	128 ± 22
0.2	32 ± 9	14 ± 10

En la Figura 64 se muestran los diferentes cromatogramas obtenidos en la extracción de SCCP con las tres técnicas empleadas, tras inyectar directamente de 5 µL de los extractos obtenidos. Como se puede ver, la recuperación que ofrecía la extracción con microondas era similar a la recuperación que ofrecía la extracción con ultrasonidos. En cambio, las recuperaciones con MSPD eran las más elevadas.

De los ensayos descritos, se puede concluir que la extracción más favorable se obtiene con el empleo de MSPD utilizando 0.05 g de Florisil® como soporte sólido, elución con hexano y reconstitución en acetona: agua (1:2), para su posterior preconcentración con SPME.

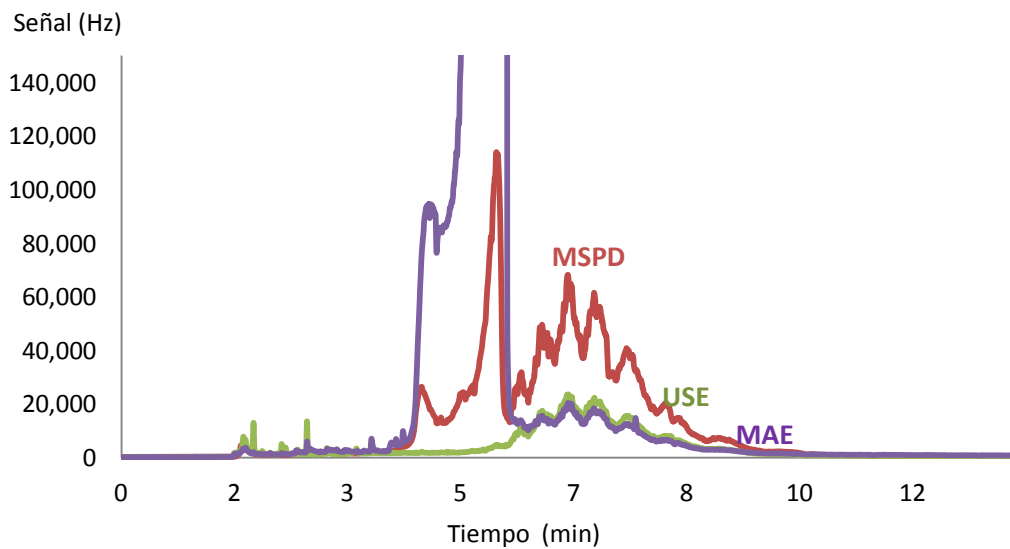


Figura 64. Comparación entre métodos de extracción para una muestra de sedimento fortificada con SCCP y procesada con MAE, USE y MSPD.

El tiempo de extracción fijado para los ensayos anteriores fue de 30 minutos. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, el tiempo de extracción es una variable que debe ser estudiada para cada analito en cada matriz. En este caso el tiempo de extracción fue probado a 15, 30, 45 y 60 minutos. A diferencia de los resultados obtenidos en la extracción de SCCP en muestras acuosas y de biota, para éste tipo de matriz el tiempo óptimo eran 60 minutos (Figura 65).

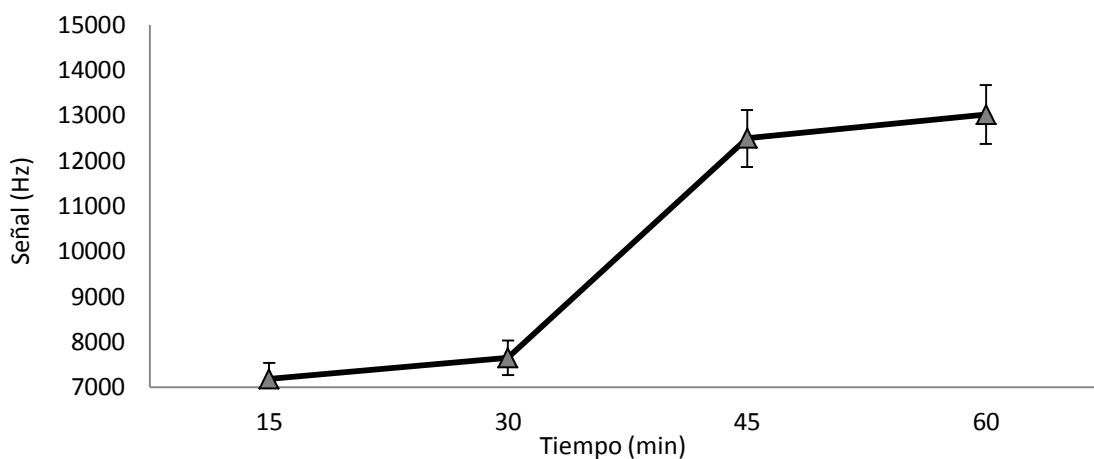


Figura 65. Influencia del tiempo de extracción SPME

A tiempos cortos las recuperaciones obtenidas eran muy bajas, siendo mínima la diferencia entre 15 y 30 minutos. Sin embargo, al aumentar el tiempo de extracción a 45 minutos la respuesta obtenida aumentaba considerablemente, incluso manteniendo la fibra

sumergida dentro de la disolución durante 60 minutos, se puede observar un ligero aumento. A la vista de los resultados, se consideró fijar 60 minutos como tiempo de extracción óptimo. Mayores tiempos de extracción podrían aumentar la recuperación de los analitos, pero sin olvidar que el objetivo de este trabajo es optimizar un método analítico que permita analizar SCCP a niveles de traza con el menor coste y tiempo de análisis posible.

4.3.2.2 Parámetros analíticos

La determinación de los parámetros analíticos se realizó con el empleo de diferentes muestras reales fortificadas a distintas concentraciones. Los límites de detección y cuantificación fueron determinados en peso seco, obteniendo un límite de detección de 60.6 ng/g. La recuperación media que ofrece este método es del 93%. El intervalo dinámico lineal fue estudiado analizando la muestra fortificada a diferentes concentraciones desde 181.8 ng/g hasta 8.16 µg/g ($r^2=0.9959$). La precisión del método fue determinada para una muestra fortificada con 5.44 µg/g obteniendo valores de repetibilidad del 4% (n=3) y de reproducibilidad de 8% (n=3).

4.3.2.3 Aplicación a muestras reales

Muestras reales de sedimento fueron procesadas con el procedimiento desarrollado, en concreto 52 muestras. Sólo en 5 de las muestras analizadas se detectaron SCCP, todas ellas al nivel del límite de detección. Resultados similares han sido obtenidos por Castells et al. (2008) en sedimentos de la costa de Barcelona y por Hussy et al. (2012) en sedimento de estuario.

4.3.2.4 Conclusiones

Entre las técnicas empleadas, MSPD es la más adecuada para la extracción de SCCP de muestras de sedimentos ya que ofrece las mejores recuperaciones. Como soporte sólido, el uso de Florisil ofrece buenos resultados cuando la cantidad es la adecuada, en nuestro estudio 0.05 g de Florisil por 1 g de muestra, un exceso de sorbente reduce las recuperaciones. Entre los solventes y mezclas testadas para la elución, se pudo comprobar que el hexano es el más adecuado. Por otro lado, la preconcentración de los analitos empleando SPME mejora la sensibilidad permitiendo reducir los límites de detección.

En general, haciendo una comparativa con los métodos propuestos por otros autores (Tabla 30), el método descrito en este trabajo permite recuperaciones del mismo orden que otros trabajos, minimizando las cantidades de muestra y reactivos. Además, este método es más simple, ya que no requiere pasos previos a la extracción, como el pretratamiento de la muestra.

Tabla 30. *Comparativa bibliográfica de métodos de extracción de SCCP en sedimento*

Muestra	Pretratamiento		Extracción		Separación/ Técnica de detección	Recuperación	Ref.
	Reactivo	Técnica	Disolvente	Técnica			
Sedimento 10 g	Florisil®	Elución en columna	Hexano: acetona (300 mL)	Soxhlet	GC-MS/MS	95%	Castells et al., 2008
Sedimento 10 g	Florisil®	Elución en columna	Hexano: acetona (300 mL)	Soxhlet	GC-ECI-MS	nd	Parera et al., 2004
Sedimento 5 g	Florisil®	Elución en columna	Hexano: acetona (30 mL)	MAE	GC-ECI-MS	90%	Parera et al., 2004
Sedimento 10 g	Sílica gel	Elución en columna	DCM (120 mL)	Disolvente en caliente	GC-ECI-MS	92%	Příbylová et al., 2006
Sedimento 1 g	-	-	Hexano (2 mL)	MSPD (C ₁₈ -Florisil)	SPME-GC- μ ECD	93%	Este trabajo

nd. No disponible

4.5 OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS

En el desarrollo de este trabajo de tesis, además de los métodos ya descritos, fueron utilizados métodos desarrollados por otros autores. De este modo fue posible el análisis de las sustancias en las matrices dictadas por la normativa. A continuación se describen brevemente los métodos y los contaminantes estudiados en cada matriz.

4.5.1 DETERMINACIÓN DE FENOLES EN MUESTRAS DE AGUA

Los analitos son extraídos de la matriz acuosa por microextracción en fase sólida (SPME) y analizados por cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (GC-MS). El procedimiento detallado del método utilizado se puede encontrar en “Guidelines for alkylphenols estimation as alkylphenol polyethoxylates pollution indicator in waste water treatment plant effluents” (Moliner-Martínez et al., 2013).

4.5.2 DETERMINACIÓN DE HAP EN MUESTRAS DE AGUA

La determinación de HAP en muestras de agua se basa en el análisis con cromatografía líquida capilar acoplada a microextracción en fase sólida. Este método ha sido extensamente detallado en el trabajo “In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples” (Chafér-Pericas et al., 2007).

4.5.3 DETERMINACIÓN DE COV EN MUESTRAS DE AGUA

La determinación de COV en muestras acuosas se basa en la extracción de los analitos de la matriz acuosa mediante microextracción en fase sólida (SPME) y posteriormente son analizados por cromatografía gaseosa con detector de ionización en llama (GC-FID). Una explicación más detallada de este método se puede encontrar en “Study of the influence of temperature and precipitations on the levels of BTEX in natural waters” (Moliner-Martínez et al., 2013).

4.5.4 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA

El método utilizado para el análisis de ftalatos en muestras acuosas fue el desarrollado por Chafér-Pericas et al. (2008) en el trabajo: “Automatic in-tube SPME and fast liquid chromatography: A cost-effective method for the estimation of dibutyl and di-2-ethylhexyl phthalates in environmental water samples”. Dicho método se basa en el análisis mediante cromatografía líquida, previa preconcentración de los analitos con SPME.

4.5.5 DETERMINACIÓN DE TRIAZINAS EN MUESTRAS DE AGUA

El método de análisis empleado es cromatografía líquida capilar de columnas acopladas con detector de fila de diodos (CLC-DAD), previa microextracción en tubo (ITSPME) acoplada a la cromatografía. El método está desarrollado de forma detallada en “On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples” (Chafér-Pericas et al., 2006)

4.5.6 DETERMINACIÓN DE FENILUREAS EN MUESTRAS DE AGUA

Para la determinación de herbicidas tipo urea, se utilizó la misma que técnica que para las triazinas. Los analitos eran extraídos mediante microextracción en tubo acoplada a cromatografía y empleando un detector de fila de diodos. Más detalles sobre el desarrollo de este método se pueden encontrar en: “Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography” (Moliner-Martinez et al., 2011) y “Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra –high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry” (Masiá et al., 2013).

4.5.7 DETERMINACIÓN DE ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS DE AGUA

La determinación de insecticidas organofosforados en muestras acuosas se realiza con el mismo método empleado en el análisis de HAP. Como ya se ha comentado anteriormente, este método está desarrollado en el trabajo “In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorous pesticides in untreated environmental water samples” (Chafér-Pericas et al., 2007).

4.5.8 DETERMINACIÓN DE FENOLES EN MUESTRAS DE BIOTA

El método empleado en la extracción y análisis de fenoles consiste en cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (GC-MS), previa microextracción en fase sólida (SPME). Más detalles sobre la metodología utilizada para esta determinación se puede encontrar en el trabajo “Alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in eastern Mediterranean Spanish coastal marine bivalves” (Bouzas et al., 2011)

4.5.9 DETERMINACIÓN DE HAP EN MUESTRAS DE BIOTA

El método empleado en la extracción y análisis de los hidrocarburos poliaromáticos es el desarrollado por Campíns-Falcó et al. (2008), “New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic

aromatic hydrocarbons in bivalves”. Este método se basa en la extracción de los analitos mediante dispersión de la matriz en fase sólida, empleando para ello acetonitrilo y agua. Los analitos son posteriormente analizados mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica (LC-FD).

4.5.10 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE BIOTA

Para la determinación de ftalatos se emplea el mismo método de extracción que para los HAP, los analitos son separados mediante cromatografía líquida capilar de columnas acopladas con detector de fila de diodos (CLC-DAD). Este método ha sido desarrollado y publicado en el trabajo “A miniaturized method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in bivalves as bioindicators” (Muñoz-Ortuño et al., 2012), donde se detalla el proceso de extracción y determinación.

4.5.11 DETERMINACIÓN DE FENOLES EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS

Para la determinación de estos compuestos los analitos son extraídos en un baño de ultrasonidos y posteriormente los analitos son extraídos de la matriz acuosa por microextracción en fase sólida (SPME). Finalmente los analitos son analizados por cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (GC-MS).

4.5.12 DETERMINACIÓN DE HAP EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS

Para la determinación de HAP los analitos son extraídos mediante dispersión de la matriz en fase sólida y posteriormente son analizados por cromatografía líquida convencional con detección fluorescente (LC-FD) acoplada a microextracción en fase sólida en tubo (ITSPME). El desarrollo de este método se puede ver en el trabajo “Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: Application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments” (Moliner-Martínez et al., 2012).

4.5.13 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS

Para la determinación de ftalatos se emplea el mismo método de extracción que el empleado para HAP, pero los analitos se procesan mediante cromatografía líquida capilar de columnas acopladas con detector de fila de diodos (CLC-DAD). Para el análisis de algunas muestras se utiliza la detección por espectrometría de masas. El trabajo “A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments” (Muñoz-Ortuño et al., 2013) muestra el procedimiento desarrollado para esta determinación.

4.5.14 DETERMINACIÓN DE ORGANOESTÁNNICOS EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS

El método empleado para la determinación de compuestos organoestánicos en muestras de sedimentos es similar al descrito para determinación de estos compuestos en muestras de bivalvos. Los analitos son extraídos de la matriz mediante un baño ultrasonidos y empleando como solvente ácido acético. Posteriormente, son derivatizados utilizando STEB como derivatizante en medio tamponado ligeramente ácido y preconcentrados utilizando SPME. El análisis de estas muestras se lleva a cabo empleando un sistema gases con detector de masas.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Arambarri I., Garcia R., Millan E. Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere*, 51 (2003) 643-649
- Baugros J.B., Giroud B. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta*, 607 (2008) 191-203
- Bayen S., Obbard J.P., Thomas G.O., Chlorinated paraffins: a review of analysis and environmental occurrences. *Environment International* 32 (2006) 915-929
- Belkin M.A., Olson L.K., Caruso J.A., Radiofrequency Glow Discharge as an Ion Source for Gas Chromatography With Mass Spectrometric Detection *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12 (1997) 1255-1261
- Brás I., Santos L. Alves A., Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gas chromatography-electron-capture detection after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 891 (2000) 305-311
- Bravo M., Lespes G., Pinochet, H., Potin-Gautier, M., Identification of sulfur interferences during organotin determination in harbour sediment samples by sodium tetraethyl borate ethylation and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1046 (2004) 217-224
- Borgen A.R., Schlabach M., Kallenborn R., Fjeld E., Polychlorinated Alkanes in Fish from Norwegian Freshwater. *The Scientific World Journal* 2(2002) 136-140.
- Bouzas A., Aguado D., Martí N., Pastor J.M., Herráez R., Campins P., Seco A.. Alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in eastern Mediterranean Spanish coastal marine bivalves. *Environmental Monitoring Assessment*. 176 (2011) 169-181.
- Campíns-falcó P., Verdú-Andrés J., Sevillano-Cabeza A., Molins-Legua C., Herráez-Hernández R. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211 (2008) 13
- Castells P., Santos F.J., Galceran M.T., Solid-phase microextraction for the analysis of short-chain chlorinated paraffins in water samples. *Journal of Chromatography A*, 984 (2003) 1-8
- Castells P., Santos F.J., Galceran M.T., Solid-phase extraction versus solid-phase microextraction for the determination of chlorinated paraffins in water using gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1025 (2004) 157-162
- Castells P., Parera J., Santos F.J., Occurrence of polychlorinated naphthalenes, polychlorinated biphenyls and short-chain chlorinated paraffins in marine sediments from Barcelona (Spain) M.T., Occurrence of polychlorinated naphthalenes, polychlorinated biphenyls and short-chain chlorinated paraffins in marine sediments from Barcelona (Spain). *Chemosphere*, 70 (2008) 1552-1562
- Carvalho P.N., Pinto L.F., Basto M.C.P., Vasconcelos M.T.S.D. 2007. Headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry method for butyltin analysis in sediments: optimization and validation. *Microchemical Journal*, 87 (2007) 147-153

- Chafér-Pericas C. Herraéz-Hernández R., Campíns-Falcó P. On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples". *Journal of Chromatography A* 1125 (2006) 159-171.
- Chafér-Pericas C. Herraéz-Hernández R., Campíns-Falcó P. In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples. *Journal of Chromatography A* 1141 (2007) 10-21.
- Chafér-Pericas C., Campíns-Falcó P., Prieto-Blanco M.C. Automatic in-tube SPME and fast liquid chromatography: A cost-effective method for the estimation of dibutyl and di-2-ethylhexyl phthalates in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, 610 (2008) 268-273
- Chi-Chi Chou, Maw-Rong Lee. Determination of organotin compounds in water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1064 (2005) 1-8
- Darko G., Akoto O., Opong C. Persistent organochlorine pesticide residues in fish, sediments and water from Lake Bosomtwi, Ghana. *Chemosphere* 72 (2008) 21-24
- Derouiche A., Ridha M. Morizur J.P., Taphanel M.H. Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138 (2007) 231-243
- Gonçalves C. y Alpendurada M.F. Comparison of three different Poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticides multiresidues in water samples: structure and efficiency. *Journal of Chromatography A*, 963 (2002) 19-26
- Hildebrandt A., Guillamón M., Lacorte S., Tauler R., Barceló D. (2008) Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality. *Water Research*, 42 (13) 3315-3326
- Huang X., Qiu N., Yuan D. Direct enrichment of phenols in lake and sea water by stir bar sorptive extraction based on poly (vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1194 (2008) 134-138.
- Hussy I., Webster L., Russell M., Moffat C., Determination of chlorinated paraffins in sediments from the Firth of Clyde by gas chromatography with electron capture negative ionisation mass spectrometry and carbon skeleton analysis by gas chromatography with flame ionisation detection. *Chemosphere* 88 (2012) 292-299
- Ikonomou M.G., Fernández M.P., He T., Cullon D., Gas chromatography–high-resolution mass spectrometry based method for the simultaneous determination of nine organotin compounds in water, sediment and tissue. *Journal of Chromatography A*, 975 (2002) 319-333
- Jiang G.B., Xu F.Z., Zhang F.J. Dioctyltin and tributyltin detection at trace levels in water and beverages by capillary gas chromatography with flame photometric detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 363 (1999) 256-260
- Li Q., Wang X., Yuan D. Preparation of solid-phase microextraction fiber coated with single-walled carbon nanotubes by electrophoretic deposition and its application in extracting phenols from aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1305-1311.

- Liu X., Ji Y., Zhang Y., Zhang H., Liu M. Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of phenols in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1165 (2007) 10-17
- ^aLong A.R., Crouch M.D., Barker S.A., Multiresidue matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticides in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 74 (1991) 667-670
- ^bLong A.R., Soliman M.M., Barker S.A., Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticides in beef fat. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 74 (1991) 493-496
- Martínez et al., Rami M. I., Montes R., Hernanz D., Rubí E., Rodríguez I., Cela Torrijos R. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1072 (2005) 83-91
- Masiá A., Moliner Martínez Y., Muñoz-Ortuño M., Pico Y., Campíns Falcó P. Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1306(2013)1-11
- Miglioranza K.S.B., Aizpun de Moreno J.E., Moreno V.J., Osterrieth M.L., Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of "Los padres" pond watershed, Argentina. *Environmental Pollution* 105 (1999) 91-99
- Moliner-Martínez Y., González-Fuenzalida R.A., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P., Verdú-Andrés J. Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: Application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments, *Journal of Chromatography A* 1263 (2012) 43-50.
- Moliner-Martínez Y., Pastor-Carbonell J. M., Bouzas A., Seco A., Abargues M. R., Campíns-Falcó P. Guidelines for alkylphenols estimation as alkylphenol polyethoxylates pollution indicator in wastewater treatment plant effluents. *Analytical Methods* 5 (2013) 2209.
- Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Verdú-Andrés J., Campíns-Falcó P., Garrido-Palanca C., Molins-Legua C., Seco A. Study of the influence of temperature and precipitations on the level of BTEX in natural waters. *Journal of Hazardous Materials* (2013). Doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.07.037
- Moore S., Vromet L., Rondeau B., Comparison of metastable atom bombardment and electron capture negative ionization for the analysis of polychloroalkanes *Chemosphere*, 54 (2003) 453-459
- Muñoz-Ortuño M., Moliner-Martínez Y., Cogollos-Costa S., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. A miniaturized method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments. *Journal of Chromatography A* 1260 (2012) 169-173.
- Muñoz-Ortuño M., Argente-García A., Moliner-Martínez Y., Verdú-Andrés J., Herráez-Hernández Campíns-Falcó P. A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments. *Journal of Chromatography A* (2013) Corrected proofs.

- Pan W., Xu H., Cui Y., Song D., Feng Y-Q. Improved liquid-liquid-liquid microextraction method and its application to analysis of four phenolic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1203 (2008) 7-12.
- Parera J., Santos F.J., Galceran M.T., Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction for the analysis of short-chain chlorinated alkanes in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1046 (2004) 19-26
- Parrot S., Lambas-Sena L., Senetac S., Denoroy L., Renaud B. Highly sensitive assay for the measurement of serotonin in microdialysates using capillary high-performance liquid chromatography with electrochemical detection *Journal of Chromatography B* 850 (2007) 303-309
- Peñalver A., Pocurull E., Borrull F., Marcé R.M. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A* 953 (2002) 79-87.
- Pirard C., De Pauw E., Focant J.F., Suitability of tandem-in-time mass spectrometry for polybrominated diphenylether measurement in fish and shellfish samples: Comparison with high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1115 (2006) 125-132
- Příbylová P., Klánová J., Holoubek I. Screening of short- and medium-chain chlorinated paraffins in selected riverine sediments and sludge from the Czech Republic *Environmental Pollution* (2006), 144, 248-254
- Rapsomanikis S. Derivatization by ethylation with sodium tetraethylborate for the speciation of metals and organometallics in environmental samples. *Analyst*, 119 (1994) 1429-1439
- Reth M., Zencak Z., Oehme M., First study of congener group patterns and concentrations of short- and medium-chain chlorinated paraffins in fish from the North and Baltic Sea. *Chemosphere*, 58 (2005) 847-854
- Ruiz-Jimenez J., Luque de Castro M.D. In-column micro-high-performance liquid chromatographic concentration-separation prior to ultraviolet detection for the determination of chlorophenols in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1174 (2007) 78-84.
- Sakamoto M., Tsutsumi T. Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. *Journal of Chromatography A*, 1028 (2004) 63-74.
- Schubert P., Rosenberg E., Grasserbauer M. Comparison of sodium tetraethylborate and sodium tetra(n-propyl)borate as derivatization reagent for the speciation of organotin and organolead compounds in water samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366 (2000) 356-360
- Shirey R.E. Fiber Selection for Semivolatile Analytes Using Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38 (2000) 279-288
- Suliman F.E.O., Al-Kindi S.S., Al-Kindy S.M.Z., Al-Lawati H.A.J. Analysis of phenols in water by high-performance liquid chromatography using coumarin-6-sulfonyl chloride as a fluorogenic reagent. *Journal of Chromatography A*, 1101 (2006) 179-184
- Tomy G.T., Stern G.A., Muir D.C.G., Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Westmore J.B. Quantifying C10-C13 Polychloroalkanes in Environmental Samples by High-Resolution Gas Chromatography/Electron Capture Negative Ion High-Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 2762-2771

Xu H., Liao Y., Yao J. Development of a novel ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction and its application to the analysis of chlorophenols in real aqueous samples *Journal of Chromatography A*, 1167 (2007) 1-8.

Xue N., Xu X., Jin Z. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere* 61 (2005) 1594-1606

Wang Z., Ma X., Lin Z., Na G., Yao Z., Cogener specific distributions of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment and mussel (*Mytilus edulis*) of the Bo Sea, China. *Chemosphere* 74 (2009) 896-901

Zencak Z., Reth M., Oehme M., Determination of Total Polychlorinatedn-Alkane Concentration in Biota by Electron Ionization-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 1957-1962

CAPÍTULO 5.

SUSTANCIAS PRIORITARIAS EN EL

LITORAL DE LA COMUNIDAD

VALENCIANA

Los métodos descritos en el capítulo anterior se aplicaron para la determinación de la calidad de las aguas costeras y de transición de la Comunidad Valenciana.

Para el cálculo de la concentración media anual de un determinado compuesto, en cualquiera de las tres matrices (agua, biota o sedimento), el procedimiento es el siguiente: si en ninguno de los muestreos se ha detectado concentración, el resultado indicado corresponde a la mitad de límite de detección. Si se ha detectado concentración en alguno de los muestreos realizados, se calcula la media asignando este valor como concentración.

Tal y como dicta la Directiva 2008/105/CE las masas de agua cumplirán la NCA expresada como media anual cuando la media aritmética de las concentraciones medidas distintas veces durante el año, en cada punto de control representativo de la masa de agua, no exceda de la norma. Por otro lado, cumplirá la NCA expresada como concentración máxima admisible cuando la concentración medida en cualquier punto de control representativo de la masa de agua no supera la norma.

Como ya se ha comentado en el punto 1.2.3 el principal objetivo de la DMA es conseguir un buen estado químico para las aguas de la Comunidad Europea, y se considera un buen estado químico de las aguas cuando las NCA no sean superadas. Siguiendo este criterio, la DMA clasifica el estado de estas masas con un código de colores: azul si éste es bueno y rojo si no lo es.

5.1 MUESTRAS DE AGUA

En este apartado se pretende dar una visión general del seguimiento y monitorización de sustancias prioritarias en aguas costeras y aguas de transición, de la Comunidad Valenciana.

Tal y como se explicó en el apartado 3.6, para esta matriz se realizó un reconocimiento inicial (control de vigilancia) y un programa de seguimiento (control operativo) de las distintas masas de agua definidas en el litoral de la Comunidad Valenciana.

5.1.1 AGUAS DE TRANSICIÓN

5.1.1.1 Control de vigilancia (2008-2009)

En estos muestreos se analizaron, en las masas de aguas de transición (Estuario río Júcar, Estany de Cullera y Salinas de Santa Pola), la lista completa de sustancias prioritarias y otros contaminantes de la Directiva 2008/105/CE (Anexo I), con el fin de evaluar si se cumplían las normas de calidad (NCA) establecidas en dicha directiva.

De todas las sustancias analizadas, únicamente el endosulfán superó la norma de calidad para la concentración máxima admisible (NCA-CMA=0.004 µg/L), en la muestra tomada en mayo

de 2009 en la estación TES003, alcanzando un valor de 0.019 µg/L. Para el resto de compuestos analizados que poseen una NCA-CMA establecida, las concentraciones detectadas estaban por debajo de dicha norma.

A partir de las concentraciones puntuales se calcularon las concentraciones medias anuales. Con estos valores se determinaron los compuestos que superan la norma de calidad como media anual (NCA-MA) tanto por estación como por zona. Concretamente, en el período estudiado (julio de 2008-mayo de 2009) la NCA-MA se superó para cuatro compuestos: pentaclorobenceno, dietilhexilftalato, endosulfán y difenil-éteres-bromados. La Tabla 31 resume las masas de agua de transición que incumplieron la NCA-MA así como los compuestos que superaron dichas normas.

- *Pentaclorobenceno*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.0007 µg/L) se superó en cinco estaciones: SPC001, SPC003, SPC006A, SPC007A, SPC008. La concentración media obtenida en estos puntos de muestreo oscila entre 0.0027 µg/L y 0.0127 µg/L. Todas estas estaciones con concentraciones medias de pentaclorobenceno superiores a la NCA-MA pertenecen a la zona 0302 (Salinas de Santa Pola). Realizando la media anual para el pentaclorobenceno en la zona 0302 se observó que la concentración de dicha sustancia superó la NCA-MA, alcanzando un valor de 0.0049 µg/L.

- *Dietilhexilftalato*

La NCA-MA establecida (1.3 µg/L) se superó para dietilhexilftalato en cuatro puntos de muestreo, tres de ellos pertenecientes a la zona de la Salina de Santa Pola (SPC001, SPC003 y SPC007A) y uno de ellos (TJU001) perteneciente a la zona del río Júcar. La concentración media obtenida en estos puntos de muestreo oscilaba entre 1.4 µg/L y 3.1 µg/L.

Haciendo la media anual por zona para este compuesto se observa que en ninguna de las dos zonas donde se han encontrado estaciones afectadas por dietilhexilftalato en concentraciones superiores a la NCA-MA se supera dicha norma.

- *Endosulfán*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.0005 µg/L) se superó en un único punto de muestreo, concretamente el TES003, alcanzando una concentración media de 0.003 µg/L. La zona 0202 (Estany de Cullera) a la que pertenece dicha estación de muestreo presentaba una concentración media de esta sustancia superior a la NCA-MA.

- *Difenil-éteres-bromados*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.0002 µg/L) se superó solamente en dos estaciones, TJU001 y TJU002, alcanzando una concentración media de 0.0015 µg/L y 0.0027 µg/L, respectivamente. Ambas estaciones pertenecen a la zona 0201 (río Júcar), cuya concentración media anual para esta sustancia superó también la NCA-MA, con un valor de 0.0019 µg/L.

Tabla 31. *Masas de agua que incumplen NCA-MA y sustancias prioritarias que superan dicha norma. (*) Sustancias prioritarias que superan la NCA-MA solo por estación.*

Masas de agua que incumplen NCA-MA	Nombre/Población	Sustancias prioritarias que incumplen NCA-MA
0201	Estuario río Júcar	Difeniléteres bromados Dietilhexilftalato ^{*(a)}
0202	Estany de Cullera	Endosulfán
0302	Salinas Santa Pola	Pentaclorobenceno Dietilhexilftalato ^{*(b)}

Masas de agua que incumplen NCA-MA y sustancias prioritarias que superan dicha norma. () Sustancias prioritarias que superan la NCA-MA solo por estación. (a) TJU001 (b) SPC001, SPC003 y SPC007A*

5.1.1.2 Control operativo (2010-2011-2012)

Tal y como define la DMA, el control operativo debe aplicarse sobre las masas de agua que puedan no cumplir los objetivos medioambientales. Por lo que, tras los resultados obtenidos en el control de vigilancia (2008-2009), y tal y como se explicó en el apartado 3.6, los muestreos llevados a cabo en masas de transición fueron los siguientes:

En 2010 se realizaron 4 muestreos con periodicidad estacional analizando únicamente compuestos fitosanitarios, dada la elevada importancia de estos en las zonas de transición muestreadas. En 2011 se realizaron 4 muestreos con periodicidad estacional midiendo los compuestos que no habían cumplido la NCA en el control de vigilancia, así como aquellos fitosanitarios que en el muestreo de 2010 también incumplieron NCA. En 2012 se realizaron 2 muestreos, uno en febrero y otro en julio, analizando las mismas sustancias que se habían medido en 2011.

A continuación se detallan los resultados medios anuales obtenidos en cada masa de agua de transición durante las distintas campañas de muestreo realizadas durante los controles de vigilancia y operativos. De este modo se puede observar la evolución temporal de las sustancias analizadas en cada una de las masas estudiadas.

- *Masa 0302: Salinas de Santa Pola*

Tal y como se ha comentado anteriormente, pentaclorobenceno y dietilhexilftalato fueron las sustancias que superaron durante el control de vigilancia la NCA-MA. Posteriormente, se incluyó también el endosulfán al no cumplir con la norma de calidad en el muestreo de fitosanitarios de 2010.

Los gráficos incluidos en la Figura 66 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para cada compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

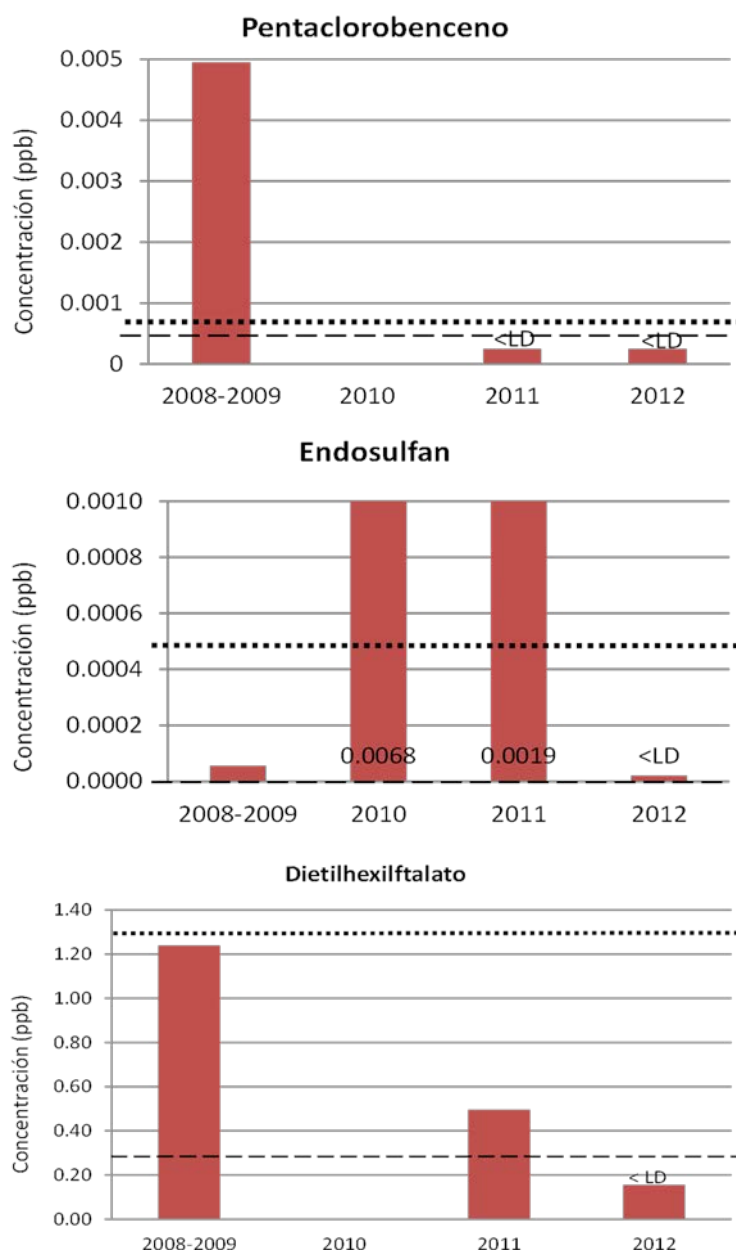


Figura 66. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 0302 (···NCA-MA; --- LD)

Tal y como se observa, el pentaclorobenceno, superó la NCA-MA (0.0007µg/L) en el control de vigilancia. En el muestreo de 2010 no se analizó este compuesto. Posteriormente, en 2011 y 2012 no se observó la presencia de pentaclorobenceno en ninguno de los muestreos realizados.

El endosulfán no superó la NCA-MA en el control de vigilancia. Sin embargo, en el muestreo realizado en 2010 (en el que únicamente se midieron fitosanitarios), y en el posterior muestreo de 2011, las concentraciones medias de endosulfán en esta zona fueron elevadas, superando la NCA-MA (0,0005 µg/L) para este compuesto. En el muestro de 2012 no se detectó este compuesto en ninguno de los muestreos realizados.

Finalmente, el dietilhexilftalato superó la NCA-MA en el control de vigilancia en algunos cotos de las salinas (concretamente el SPC001, SPC003 y SPC007A) alcanzando en toda la masa una concentración media elevada (1.2 µg/L) aunque inferior a la NCA-MA (1.3 µg/L). Los resultados medios de los muestreos de 2011 y 2012, muestran un descenso en las concentraciones de dietilhexilftalato, por debajo de la NCA-MA.

- *Masa 0202: Estany de Cullera*

Como ya se ha indicado, durante el control de vigilancia de 2008-2009 en la masa 0202 únicamente el endosulfán incumplió la NCA-MA. Posteriormente, en el muestro de compuestos fitosanitarios de 2010 el clorpirifós no cumplió con la norma de calidad establecida, por lo que se incluyó en posteriores muestreos.

Los gráficos incluidos en la Figura 67 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para cada compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

Tal y como se observa en la la Figura 67 en el control de vigilancia de 2008-2009, el endosulfán alcanzó una concentración media de 0.0030 µg/L superior a la NCA-MA establecida para este compuesto (0.0005 µg/L). Posteriormente, la concentración media anual de este compuesto se redujo, aunque en 2010 todavía se superó la NCA-MA con una concentración media de 0.0008 µg/L. Finalmente, en los muestreos de 2011 y 2012, las concentraciones medias alcanzadas se encontraron por debajo de la NCA-MA.

El clorpirifós alcanzó en 2010 una concentración media anual (0.20 µg/L) superior a la NCA-MA establecida para este compuesto (0.03 µg/L). Sin embargo, en los muestreos de 2011 y 2012 no se detectó este compuesto en ninguna de las campañas de muestreo realizadas.

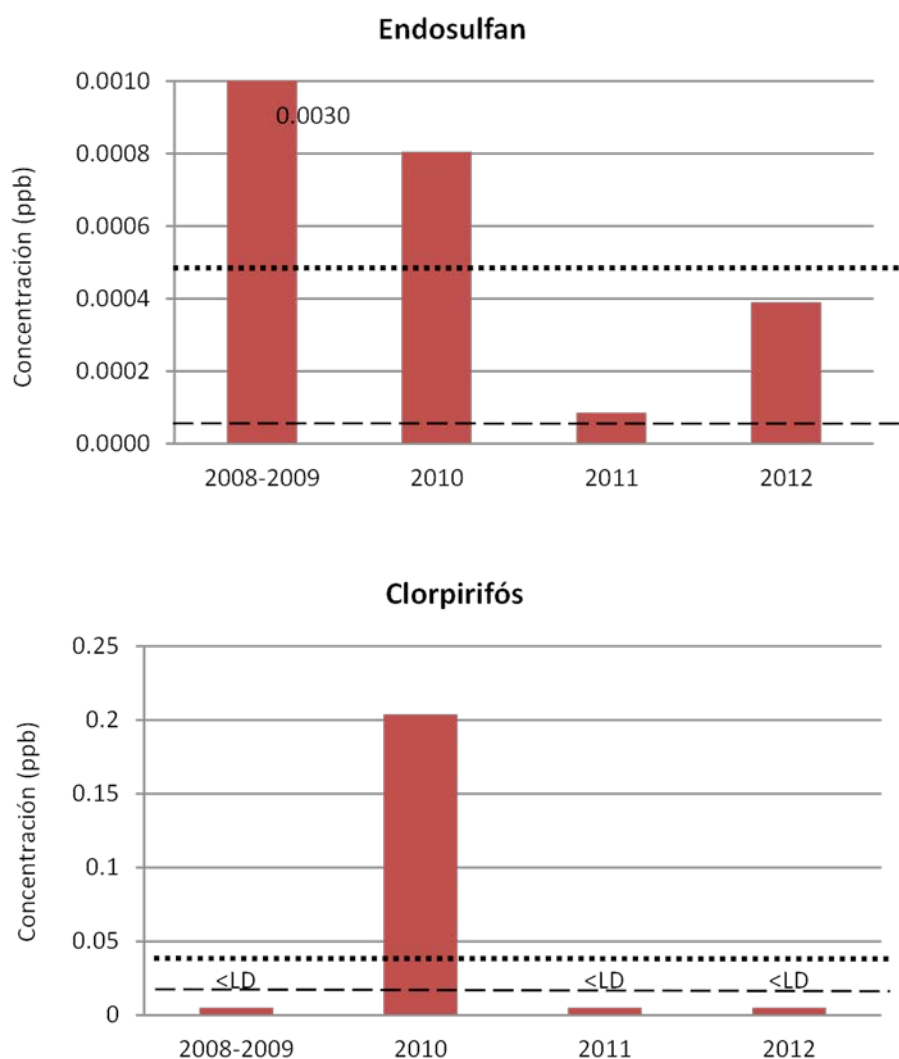


Figura 67. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 0202 (···NCA-MA; --- LD)

- **Masa 0201: Estuario río Júcar**

Como se ha mostrado durante el control de vigilancia en la masa 0201, dos compuestos incumplieron la NCA-MA: difenil-éteres-bromados y dietilhexilftalato. Posteriormente, se incluyó también el endosulfán en el muestro de fitosanitarios de 2010 al no cumplir con la norma de calidad establecida.

Los gráficos incluidos en la Figura 68 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para cada compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

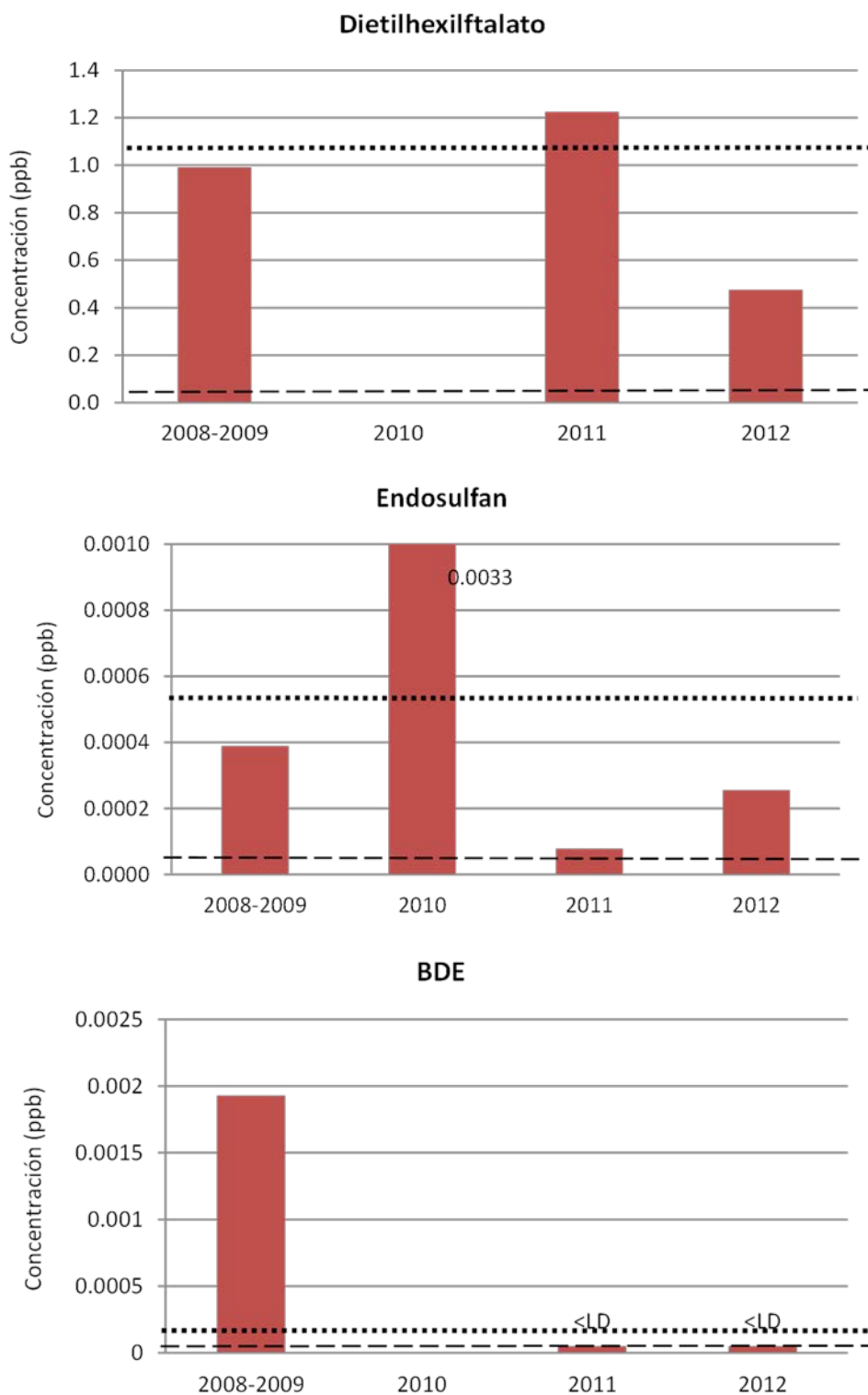


Figura 68. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 0201 (···NCA-MA; --- LD)

Los difenil-éteres-bromados (BDE) superaron la NCA-MA en esta masa en el control de vigilancia realizado durante 2008-2009. Los resultados posteriores, obtenidos en 2011 y 2012, no indican la presencia de este compuesto.

El dietilhexilftalato incumplió en 2008-2009 la NCA-MA en un único punto de muestreo de la masa de agua (TJU001), siendo la concentración media por zona (0.99 µg/L) inferior a la NCA-MA (1.3 µg/L). La concentración media anual obtenida en toda la masa en 2011 (1.2 µg/L) se encontraba cercana a la NCA-MA, aunque inferior a ésta. Finalmente, los resultados obtenidos en 2012 mostraban una concentración media inferior a la obtenida en años anteriores y en cualquier caso muy por debajo de la NCA-MA.

El endosulfán superó la NCA-MA (0.0005 µg/L) en el muestreo realizado en 2010 alcanzando una concentración media de 0.0033 µg/L. Posteriormente, en los muestreos de 2011 y 2012, las concentraciones medias de este compuesto se dejaron significativamente quedando muy por debajo de la norma de calidad.

5.1.1.3 Estado químico de las aguas transición

Siguiendo los criterios de calidad de la DMA, se puede concluir que durante el control de vigilancia (2008-2009) el estado de las tres masas de agua descritas no fue bueno, debido a la presencia de pentaclorobenceno, endosulfán y BDE.

Sin embargo, durante el control operativo (2010-2011-2012) el estado fue malo durante 2010 para las tres masas 2010 para las tres masas debido a la presencia de endosulfán y pirifós. El estado mejoró para las masas 0202 y 0201 en el período de 2011, no tanto para la masa 0302 que se mantuvo en mal estado debido a la presencia de endosulfán. Finalmente, las tres masas tuvieron un buen estado en el período de 2012 (Tabla 32).

Tabla 32. Estado químico de las aguas de transición

Masa	Control Vigilancia	Control Operativo		
	2008-2009	2010	2011	2012
0302	Malo	Malo	Malo	Bueno
0202	Malo	Malo	Bueno	Bueno
0201	Malo	Malo	Bueno	Bueno

5.1.2 AGUAS COSTERAS

5.1.2.1 Control de vigilancia (2008-2009)

Al igual que para aguas de transición, en 2008-2009 se realizó el reconocimiento inicial o control de vigilancia, de las aguas costeras del litoral de la Comunidad Valenciana.

De todas las sustancias analizadas, únicamente el tributilo de estaño superó la norma de calidad para la concentración máxima admisible (NCA-CMA=0.0015 µg/L), en la muestra tomada en mayo de 2009 en el punto DP173 (masa 0102), alcanzando un valor de 0.026 µg/L. Para el resto de compuestos analizados que poseen una NCA-CMA establecida, las concentraciones detectadas se encontraron por debajo de dicha norma.

A partir de las concentraciones puntuales se calcularon las concentraciones medias anuales. Con estos valores se indicaron los compuestos que superaban la norma de calidad como media anual (NCA-MA) tanto por punto de muestreo como por masa de agua. Concretamente, 6 compuestos superaron la NCA-MA bien en un punto de muestreo (hexaclorociclohexano y endosulfán) o bien en la masa de agua completa (pentaclorobenceno, dietilhexilftalato, octilfenol y compuestos de tributilestaño) en distintas masas de agua, como resume la Tabla 33.

- *Hexaclorociclohexano*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.002 µg/L) se superó solamente en dos puntos de muestreo, DP007 y DP049, alcanzando una concentración media de 0.0023 µg/L y 0.0021 µg/L, respectivamente.

Ninguna de las zonas afectadas por concentraciones de hexaclorociclohexano superiores a la NCA-MA (zona 001 y zona 0081) presentaba una concentración media superior a dicha norma.

- *Endosulfán*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.0005 µg/L) se superó en un único punto de muestreo, concretamente el DP043, alcanzando una concentración media de 0.00051 µg/L.

A pesar de que el punto DP043 correspondiente a la zona 006 (Puerto de Sagunto) presentó una concentración media superior a la NCA-MA, la concentración media de dicha zona no la superaba.

- *Pentaclorobenceno*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.0007 µg/L) se superó en el 15% de los puntos de muestreo. Los puntos donde se superó la NCA-MA eran: DP003, DP007, DP016, DP022, DP025 y DPU001. La concentración media obtenida en estos puntos de muestreo se encontraba entre 0.0009 y 0.0019 µg/L.

Realizando un análisis por masas de agua, las zonas con concentraciones medias de pentaclorobenceno superiores a la NCA-MA eran: zona 001 (Límite de la CV-Sierra de Irta), zona 003 (Sierra de Irta-Cabo de Oropesa), zona 004 (Cabo de Oropesa-Burriana) y zona 008 (Puerto de Valencia-Cabo de Cullera).

- *Dietilhexilftalato*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (1.3 µg/L) se superó en el 34% de los puntos de muestreo. Los puntos donde se superó la NCA-MA eran: DP003, DP007, DP022, DP025, DP027, DP043, DP049, DP055, DP073, DP102, DP113, DP114, DP163, DPU001 y la concentración media obtenida en estos puntos de muestreo estaba entre 1.3 µg/L y 5.0 µg/L.

Las masas de agua con concentraciones medias de dietilhexilftalato superiores a la NCA-MA eran: zona 001 ((Límite de la CV-Sierra de Irta), zona 004 (Cabo de Oropesa-Burriana) y zona 008 (Puerto de Valencia-Cabo de Cullera), zona 0081 (Puerto de Valencia), zona 010 (Puerto de Gandía-Cabo de San Antonio), zona 014 (Punta de les Caletes-Barranco de Aguas de Busot) y zona 016 (Cabo Huertas-Santa Pola).

- *Octilfenol*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.01 µg/L) se superó en un único punto de muestreo, concretamente el DP042, alcanzando una concentración media de 0.023 µg/L. La zona 006 (Puerto de Sagunto) a la que corresponde el punto DP042 presentaba una concentración media superior a la NCA-MA.

- *Tributilo de estaño*

Para esta sustancia la NCA-MA establecida (0.0002 µg/L) se superó en una única masa de agua, la 0102, que corresponde al Puerto de Denia (DP073), donde la concentración detectada fue 0.026 µg/L muy superior a la NCA-MA.

Para estimar el grado en que cada compuesto excedía la NCA-MA, se calculó el ratio entre la concentración media anual del compuesto y su correspondiente norma de calidad, expresada como media anual (NCA-MA). A este parámetro se le denominó "índice de superación de la NCA-MA". La Figura 69 muestra este índice para los cuatro compuestos que superaban la NCA-MA en una o más masas de agua del litoral de la Comunidad Valenciana. Como se ha comentado, otros dos compuestos (hexaclorociclohexano y endosulfán), superaron la NCA-MA en un punto de muestreo, siendo su concentración media en toda la masa inferior a la norma establecida.

Tabla 33. Masas de agua que incumplen NCA-MA y sustancias que superan dicha norma durante el control de vigilancia.

Masas de agua que incumplen NCA-MA	Nombre/Población	Sustancias prioritarias que incumplen NCA-MA
001	Límite CV - Sierra de Irtta	Pentaclorobenceno Dietilhexilftalato Hexaclorociclohexano ^{*(a)}
003	Sierra Irtta - Cabo de Oropesa	Pentaclorobenceno
004	Cabo de Oropesa - Burriana	Pentaclorobenceno Dietilhexilftalato
0041	Puerto de Castellón	Pentaclorobenceno ^{*(b)} Dietilhexilftalato ^{*(b)}
006	Puerto de Sagunto	Octilfenol Endosulfán ^{*(c)} Dietilhexilftalato ^{*(c)}
008	Puerto de Valencia - Cabo de Cullera	Pentaclorobenceno Dietilhexilftalato
0081	Puerto de Valencia	Dietilhexilftalato Hexaclorociclohexano ^{*(d)}
010	Puerto de Gandía – Cabo de San Antonio	Dietilhexilftalato
014	Punta de les Caletes - Barranco de Aguas de Busot	Dietilhexilftalato
016	Cabo Huertas - Santa Pola	Dietilhexilftalato
102	Puerto de Denia	Tributilo de estaño

Masas de agua que incumplen NCA-MA y sustancias prioritarias que superan dicha norma. (*) Sustancias prioritarias que superan la NCA-MA solo en un punto de muestreo. (a) DP007 (b) DP025 (c) DP043 (d) DP049.

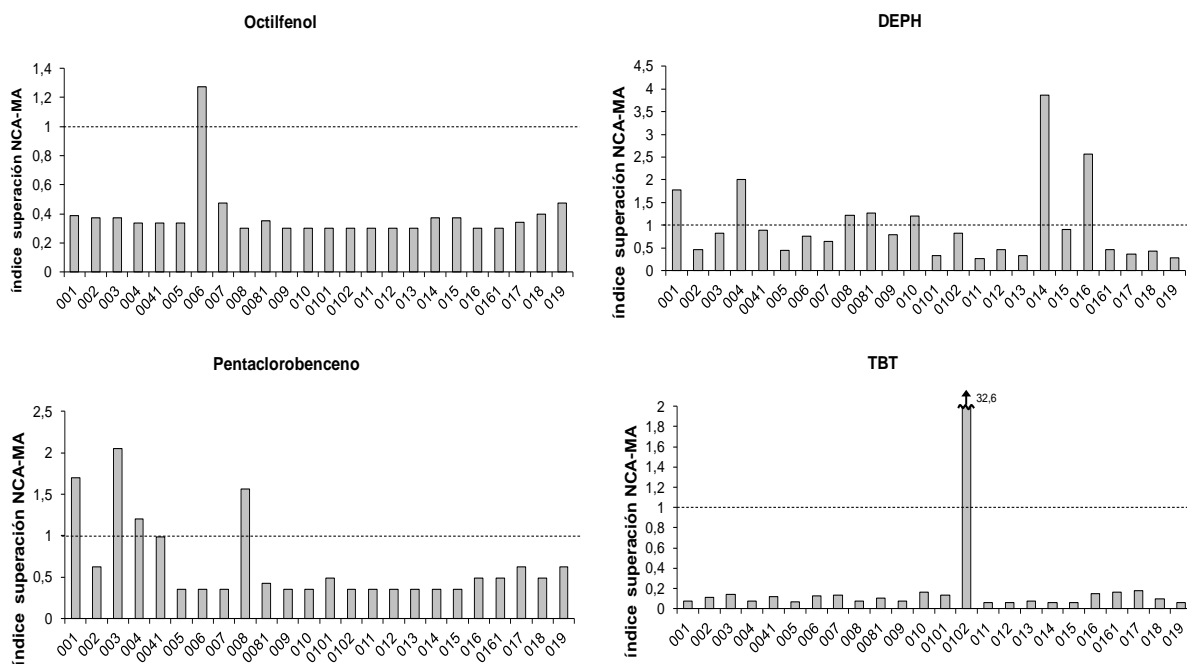


Figura 69. Índice de superación de la NCA-MA para los compuestos que superan la NCA-MA en una o más masas de agua.

- **Análisis estadístico multivariante de los resultados en aguas costeras**

Los resultados de sustancias prioritarias en aguas costeras obtenidos durante el control de vigilancia se analizaron utilizando una técnica estadística multivariante como es el Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA). Esta técnica permite sintetizar la información contenida en una matriz de datos por medio de las variables latentes y de los vectores de pesos, y presentarla gráficamente.

Con este análisis estadístico se pretendía obtener información sobre posibles similitudes y diferencias entre las distintas masas de agua en cuanto a la presencia de las sustancias prioritarias más significativas en aguas costeras (se incluyeron las más abundantes y aquellas que excedían las normas de calidad).

En el modelo PCA construido tras procesar los datos (centrando los datos y escalando a varianza unitaria) se retuvieron las 2 primeras componentes principales que explicaban un 21.9% y 20.4% de la varianza de los datos, respectivamente. Los resultados del modelo PCA obtenido se presentan gráficamente en la Figura 70. La Figura 70 (a) muestra cómo se relaciona las masas entre ellas en relación a las concentraciones de sustancias prioritarias encontradas (por ejemplo, áreas similares en cuanto a la presencia de prioritarias, se encuentran juntas en el gráfico). El gráfico de los pesos (Figura 70(b)) muestra la relación entre las variables e indica qué variables son responsables del patrón observado en la Figura 70(a).

Las conclusiones más relevantes que se extrajeron del estudio estadístico son las siguientes:

- La masa de agua 0102, que corresponde al área afectada por el puerto de Denia, se encuentra alejada sustancialmente del resto de masas (ver Figura (a)). Si observamos el gráfico de los pesos Figura 70 (b) se puede concluir que esto es debido a la elevada concentración de tributilo de estaño (TBT) que se obtuvo en dicha zona.
- No se observa una relación directa entre la proximidad geográfica de las masas de agua y el patrón de contaminación observado. Por ejemplo: las masas 006 y 013, están alejadas geográficamente y sin embargo están afectadas por los mismos contaminantes.
- Sin embargo, algunas masas cercanas geográficamente sí muestran comportamientos similares. Es el caso de las masas 001, 003 y 004 (localizadas al norte de la Comunidad Valenciana) y de las masas 017, 018 y 019 (localizadas al sur). Las masas localizadas al norte, se encuentran agrupadas en la Figura 70 (a) debido a presentar concentraciones elevadas de disolventes tales como pentaclorobenceno, tricloroetileno y tetracloruro de carbono. Las masas localizadas al sur se agrupan por presentar concentraciones elevadas de xilenos y bajas de tricloroetileno.

- Tres de las áreas influenciadas por puertos, concretamente 0041, 0081 y 0161, muestran patrones muy similares de concentración. Además, estas tres masas de agua, se corresponden con las zonas afectadas por los puertos de las tres ciudades más importantes de la Comunidad Valenciana (Puerto de Castellón, Puerto de Valencia y Puerto de Alicante).

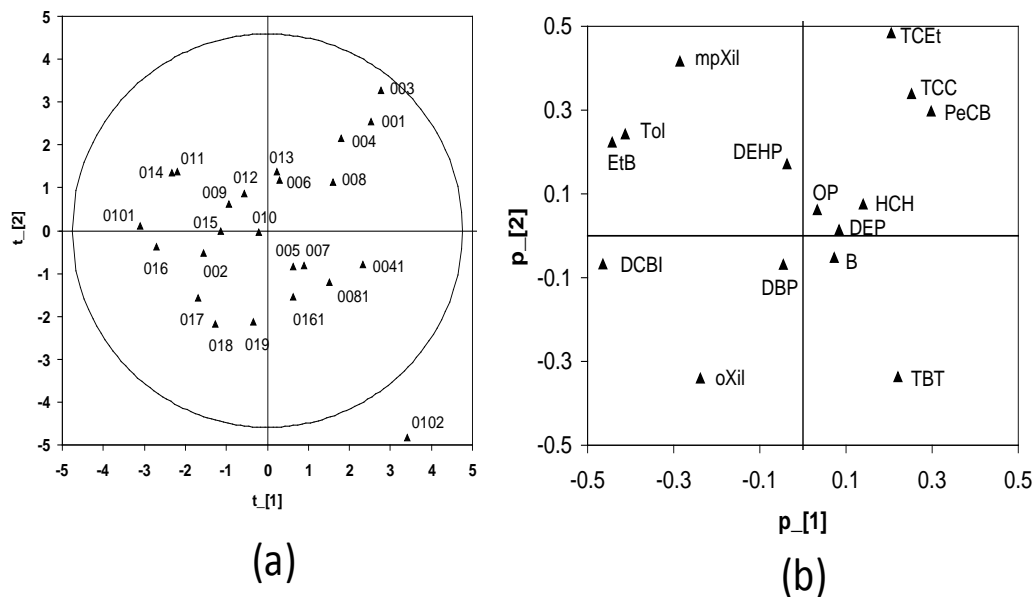


Figura 70. (a)Componentes principales retenidas. (b) Pesos de las variables en la formación de las componentes principales: incluyendo las 15 sustancias prioritarias más abundantes en aguas costeras de la Comunidad Valenciana

5.1.2.2 Control operativo (2010-2011-2012)

El control operativo se llevó a cabo en aquellas masas en las que los resultados obtenidos en el control de vigilancia (2008-2009) no eran favorables. Por tanto, los muestreos llevados a cabo en masas costeras fueron los siguientes:

En 2010 se realizaron seis muestreos con periodicidad estacional analizando únicamente las seis sustancias prioritarias que no habían cumplido las normas de calidad durante el control de vigilancia (pentaclorobenceno, dietilhexilftalato, hexaclorociclohexano, octilfenol, endosulfán y tributilo de estaño). En 2011 se realizaron cuatros muestreos con periodicidad estacional midiendo los dos compuestos que no habían cumplido la NCA en el ejercicio 2010 (dietilhexilftalato y tributilo de estaño). En 2012 se realizaron dos muestreos, uno en febrero y otro en julio, y se analizaron de nuevo las seis sustancias que habían incumplido el control de vigilancia realizado en 2008-2009.

A continuación se detallan los resultados medios anuales obtenidos en cada masa de agua costera durante las distintas campañas de muestreo realizadas durante los controles de vigilancia y operativos. De este modo se puede observar la evolución temporal de las sustancias analizadas en cada una de las masas estudiadas.

• *Masa 001*

Durante el control de vigilancia incumplieron la NCA-MA dos compuestos en esta masa de agua: pentaclorobenceno y dietilhexilftalato. Además, el hexaclorociclohexano superó la NCA-MA en un punto de muestro de esta zona (DP007), aunque la media de toda la zona se encontraba por debajo de la NCA-MA para dicho compuesto. Los gráficos incluidos en la Figura 71 y la Figura 72 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para cada compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua en el control de vigilancia (2.3 µg/L) y en el siguiente muestreo realizado en 2010 (2.4 µg/L). Posteriormente, en los muestreos de 2011 y 2012, las concentraciones medias de este compuesto fueron muy inferiores a la NCA-MA, manteniéndose en ambos casos en valores del orden del límite de detección.

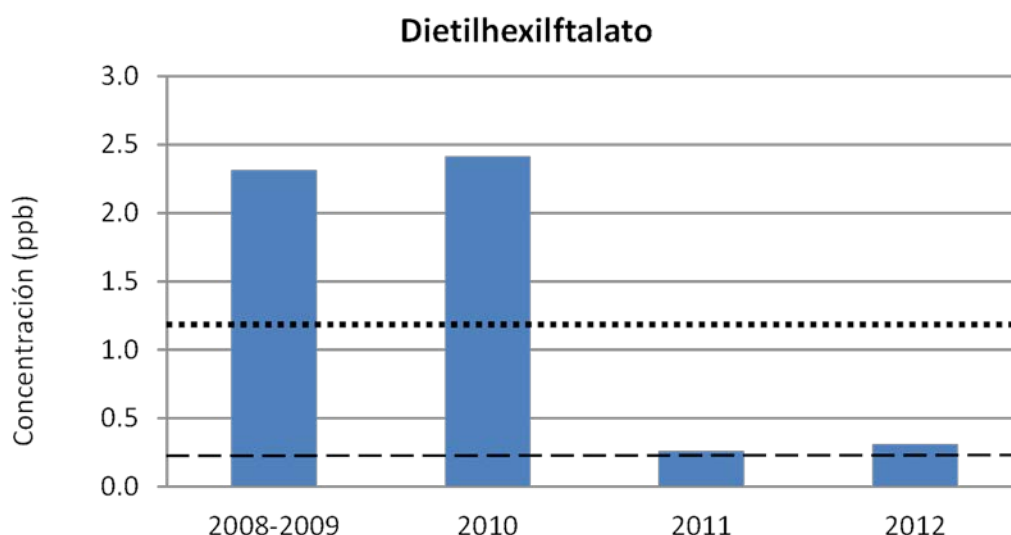


Figura 71. Concentraciones medias anuales de DEPH en la masa 001 (*En 2011 únicamente se analizó DEPH, que superó NCA en 2010) (---NCA-MA; --- LD)

El pentaclorobenceno superó la NCA-MA (0.0007 µg/L) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009. Los resultados posteriores, obtenidos en el muestreo de 2010 muestran concentraciones medias muy por debajo de la NCA-MA (0.0003 µg/L). Finalmente, en el muestreo de 2012 no se detectó este compuesto en ninguna de las muestras tomadas en esta zona.

Finalmente, el hexaclorociclohexano que en el control de vigilancia superó la NCA-MA en un punto de muestro de esta zona (DP007), mostró en 2010 y 2012 (en 2011 no se analizó) concentraciones medias anuales de 0.00029 $\mu\text{g/L}$ y de 0.00031 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, muy inferiores a la NCA-MA (0.002 $\mu\text{g/L}$).

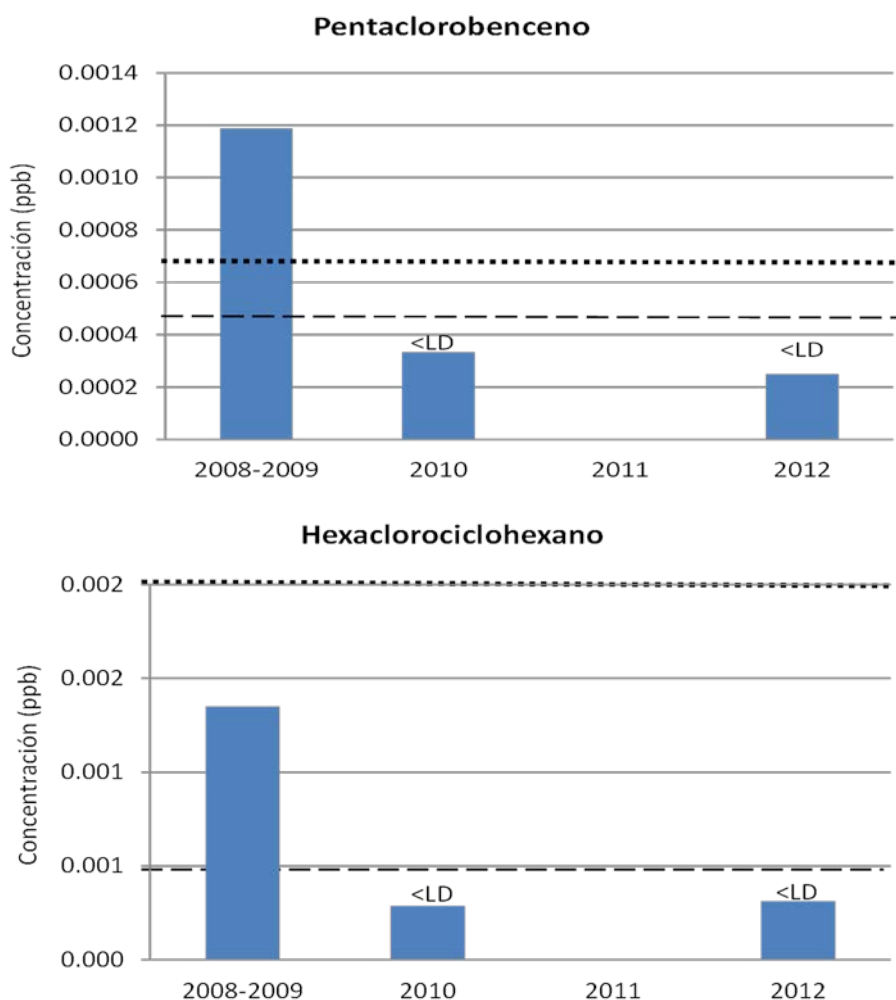


Figura 72. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 001. (···NCA-MA; -- LD)

- *Masa 003*

En esta masa de agua, únicamente el pentaclorobenceno incumplió la NCA-MA (0.0007 $\mu\text{g/L}$) durante el control de vigilancia, alcanzando una concentración media anual de 0.0014 $\mu\text{g/L}$. La Figura 73 muestra la evolución de los valores medios anuales obtenidos para este compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento. Tal y como se observa en la Figura 73, en los muestreos de 2010 y de 2012, la concentración media de pentaclorobenceno se encuentra por debajo del LD del método (LD=0.0005 $\mu\text{g/L}$).

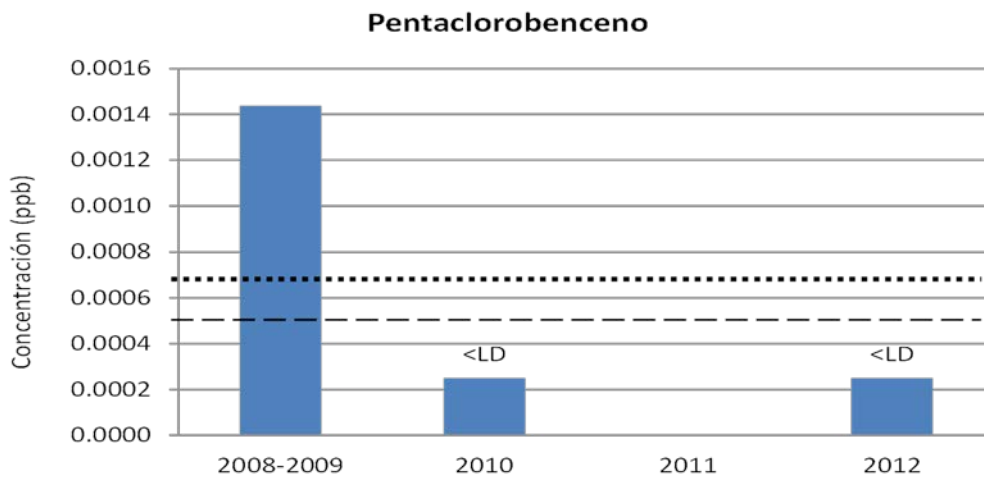


Figura 73. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 003 (···NCA-MA; --- LD)

• *Masa 004*

Durante el control de vigilancia incumplieron la NCA-MA dos compuestos en esta masa de agua: pentaclorobenceno y dietilhexilftalato. Los gráficos incluidos en la Figura 75 y la Figura 74 reflejan la evolución de los valores medios anuales obtenidos para cada compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El pentaclorobenceno, que superó la NCA-MA (0.0007 $\mu\text{g/L}$) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, mostró concentraciones medias en 2010 muy bajas, de 0.0003 $\mu\text{g/L}$.

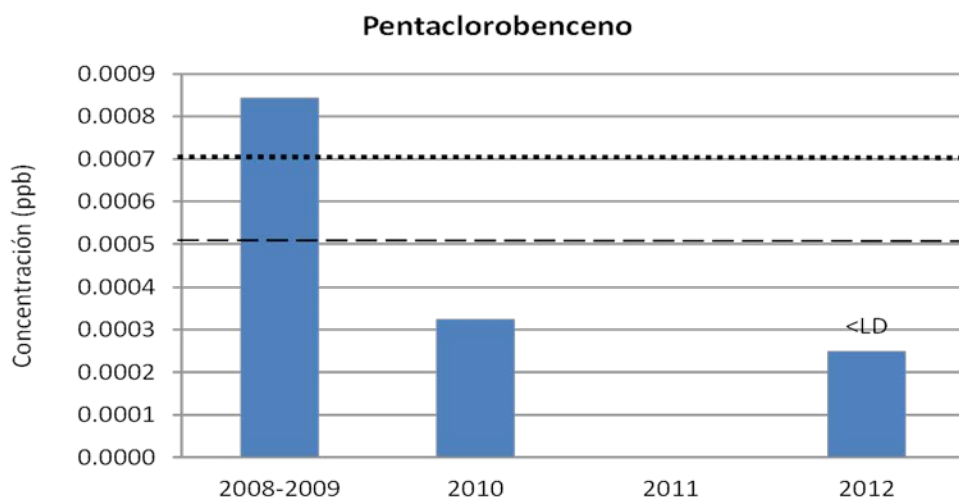


Figura 74. Concentraciones medias anuales de pentaclorobenceno en la masa 004 (···NCA-MA; --- LD)

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 $\mu\text{g/L}$) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, alcanzando una concentración media de 2.6 $\mu\text{g/L}$. En el siguiente muestreo,

realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue todavía superior (4.0 µg/L). Posteriormente, en los muestreos de 2011 y de 2012, las concentraciones alcanzadas fueron mucho más bajas (0.4 µg/L y 0.2 µg/L, respectivamente) e inferiores a la NCA-MA.

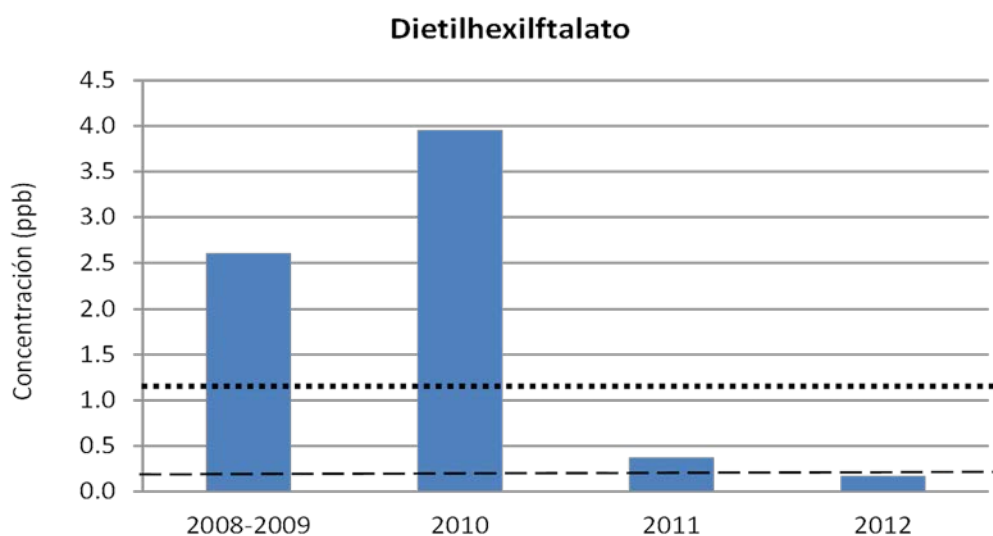


Figura 75. Concentraciones medias anuales de dietilhexilftalato en la masa 004 (···NCA-MA; --- LD)

• *Masa 0041*

Durante el control de vigilancia incumplieron la NCA-MA dos compuestos en un punto de muestreo de esta masa de agua (DP025): pentaclorobenceno y dietilhexilftalato. Los gráficos incluidos en la Figura 76 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para estos dos compuestos a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El pentaclorobenceno, que en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, mostró concentraciones medias de 0.00069 µg/L, del orden de la NCA-MA (0.0007 µg/L), mostró en 2010 una concentración media mucho más baja (0.0004 µg/L), inferior a la NCA-MA. Posteriormente, en los muestreos realizados en 2011 y 2012 no se detectó este compuesto en ninguna de las muestras analizadas.

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 µg/L) en el control de vigilancia en un único punto de muestreo (DP025), alcanzando una concentración media en toda la masa de 1.2 µg/L. En el siguiente muestreo, realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue de 1.4 µg/L, superior a la NCA-MA. Posteriormente, en los muestreos de 2011 y de 2012, las concentraciones alcanzadas fueron mucho más bajas (0.4 µg/L y 0.2 µg/L, respectivamente) e inferiores a la NCA-MA.

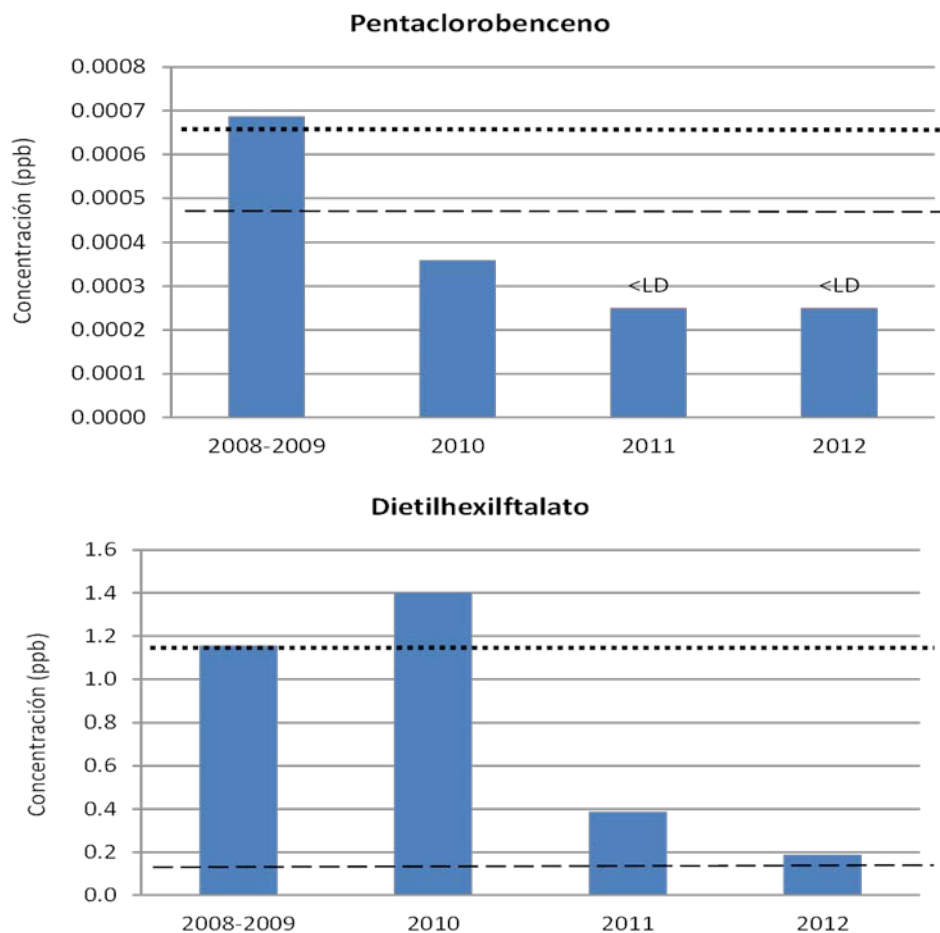


Figura 76. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 0041 (···NCA-MA; --- LD)

• *Masa 006*

Durante el control de vigilancia sólo el octilfenol incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua. Por otra parte el endosulfán superó la NCA-MA en un único punto de muestreo (DP043), aunque la media anual en toda la masa mostraba un valor inferior a la NCA-MA. Los gráficos incluidos en la Figura 77 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para estos dos compuestos y para el dietilhexilftalato a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El octilfenol, alcanzó una concentración media durante el control de vigilancia de 0.012 $\mu\text{g/L}$, superior a la NCA-MA para este compuesto (0.010 $\mu\text{g/L}$). Posteriormente, en 2010 y 2012, no se detectó este compuesto en ninguna de las muestras analizadas.

El endosulfán alcanzó una concentración media durante el control de vigilancia de 0.0003 $\mu\text{g/L}$, que estuvo cerca de superar la NCA-MA (0.0005 $\mu\text{g/L}$). Posteriormente, y tal y como

se observa en la Figura 77, las concentraciones medias de endosulfán en 2010 y 2012, se encontraban por debajo del límite de detección para dicho compuesto.

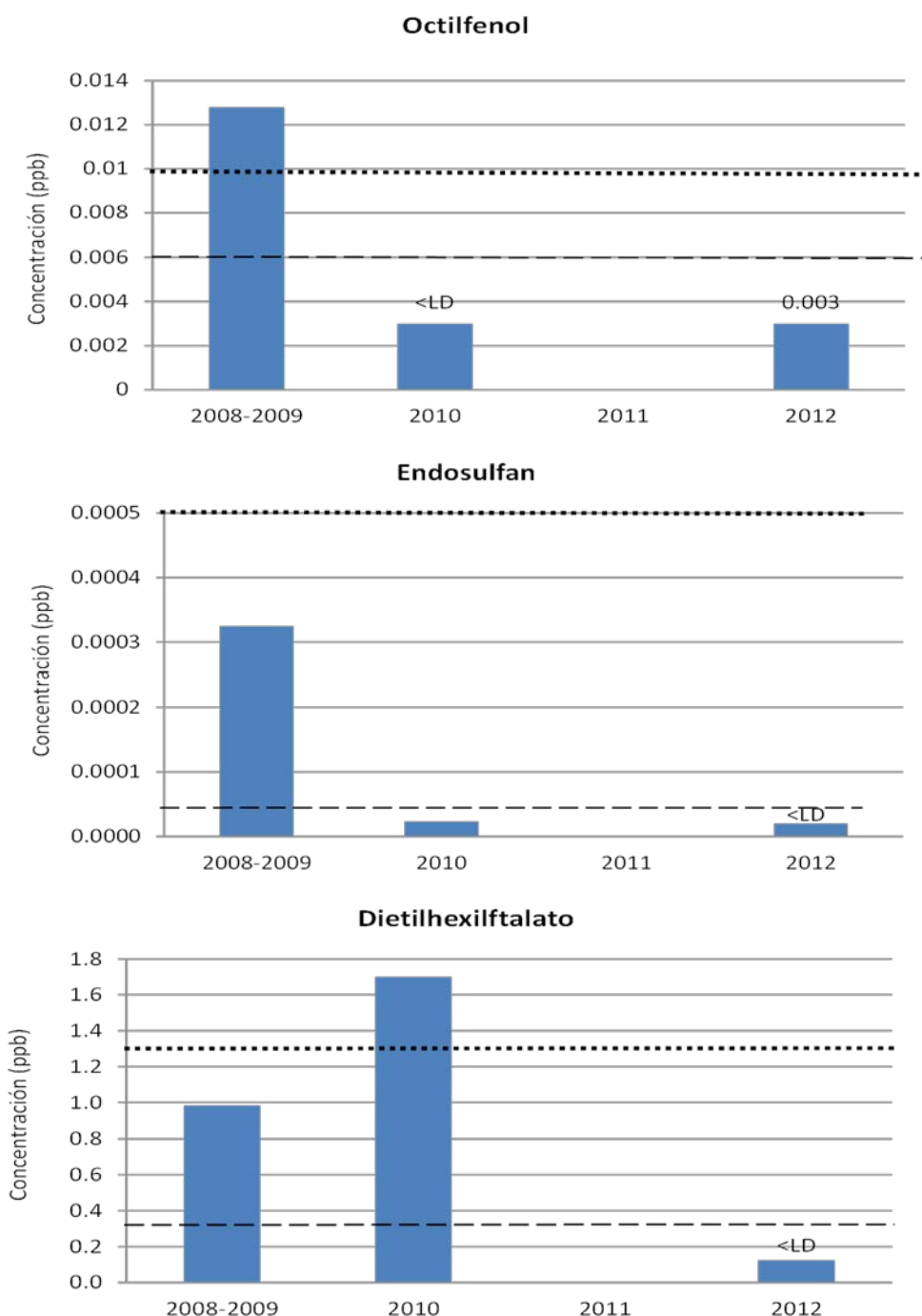


Figura 77. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 006 (···NCA-MA; --- LD)

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 $\mu\text{g/L}$) en un único punto de muestreo DP043, siendo la concentración media por masa (0.98 $\mu\text{g/L}$) inferior a dicha norma. En 2010, se

obtuvo una concentración media de 1.7 $\mu\text{g/L}$, superando así la NCA-MA. En el muestreo realizado en 2012, los valores detectados no fueron superiores al límite de detección, siendo la media de éstos menor a dicho límite.

- *Masa 008*

Durante el control de vigilancia incumplieron la NCA-MA dos compuestos en esta masa de agua: pentaclorobenceno y dietilhexilftalato. Los gráficos incluidos en la Figura 78 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para cada compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

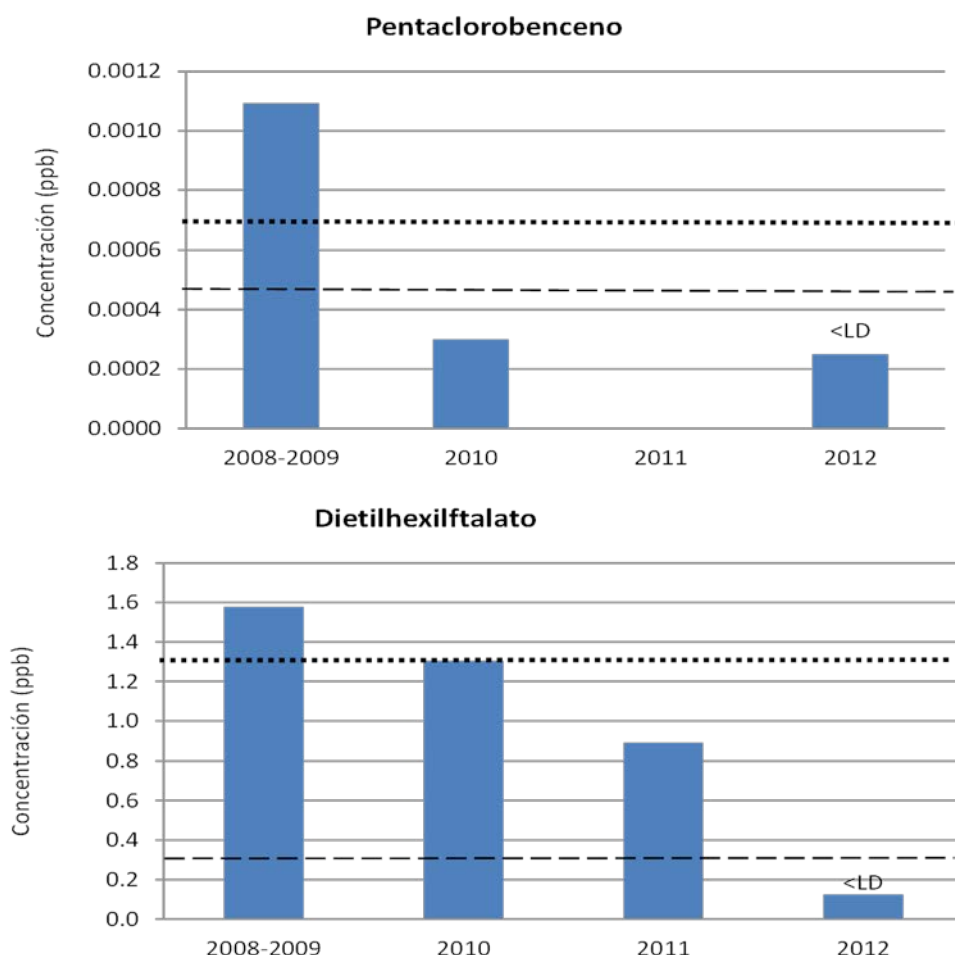


Figura 78. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 008 (···NCA-MA; --- LD)

El pentaclorobenceno, que superó la NCA-MA (0.0007 $\mu\text{g/L}$) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, mostró concentraciones medias en 2010 (0.0003 $\mu\text{g/L}$) por debajo de su límite de detección. Los resultados obtenidos en el muestreo de febrero 2012 no indicaron presencia de este compuesto en esta masa.

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 µg/L) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, alcanzando una concentración media de (1.6 µg/L). En el siguiente muestreo, realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue de 1.3 µg/L, alcanzando así de nuevo la NCA-MA. Posteriormente, en el muestreo de 2011 la concentración media de este compuesto se redujo hasta 0.9 µg/L, inferior a la NCA-MA. Finalmente, en los muestreos realizados en 2012 la concentración media fue menor al límite de detección.

• *Masa 0081*

Durante el control de vigilancia sólo el dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua. Por otra parte, el hexaclorociclohexano superó la NCA-MA en un único punto de muestreo (DP049), aunque la media anual de este compuesto en toda la masa mostró un valor inferior a la NCA-MA.

Los gráficos incluidos en la Figura 79 muestran la evolución de los valores medios anuales obtenidos para estos dos compuestos a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

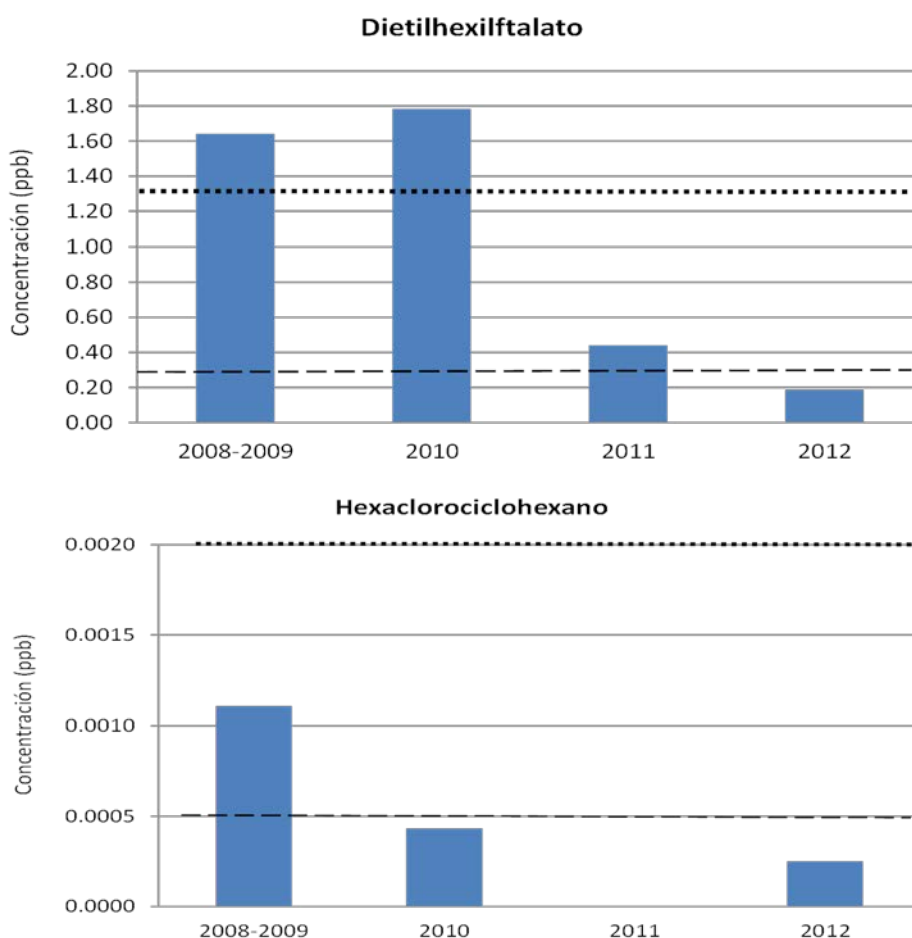


Figura 79. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 0081 (···NCA-MA; --- LD)

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 µg/L) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, alcanzando una concentración media de (1.6 µg/L). En el siguiente muestreo, realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue de 1.8 µg/L, superando así de nuevo la NCA-MA. Posteriormente, en el muestreo de 2011 la concentración media de este compuesto se redujo hasta 0.4 µg/L, inferior a la NCA-MA. Finalmente, en los resultados obtenidos en 2012 la concentración media de este compuesto se redujo hasta 0.2 µg/L.

El hexaclorociclohexano alcanzó en el control de vigilancia una concentración media de 0.001 µg/L, inferior a la NCA-MA (µg/L), aunque sí superó dicha norma en un punto de muestreo (DP049). Posteriormente, en el muestreo de 2010, la concentración media se redujo notablemente (0.0004 µg/L) y finalmente en el muestreo realizado en 2012 no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas concentraciones superiores al límite de detección.

• *Masa 010*

Durante el control de vigilancia sólo el dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua. La Figura 80 muestra la evolución de los valores medios anuales obtenidos para este compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 µg/L) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, alcanzando una concentración media de 1.6 µg/L. En el siguiente muestreo, realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue de 1.8 µg/L, superando así de nuevo la NCA-MA. Posteriormente, en el muestreo de 2011 la concentración media de este compuesto se redujo hasta 0.3 µg/L, inferior a la NCA-MA. Finalmente, en los resultados de 2012 no se detectó dicho compuesto en ninguno de los muestreos realizados.

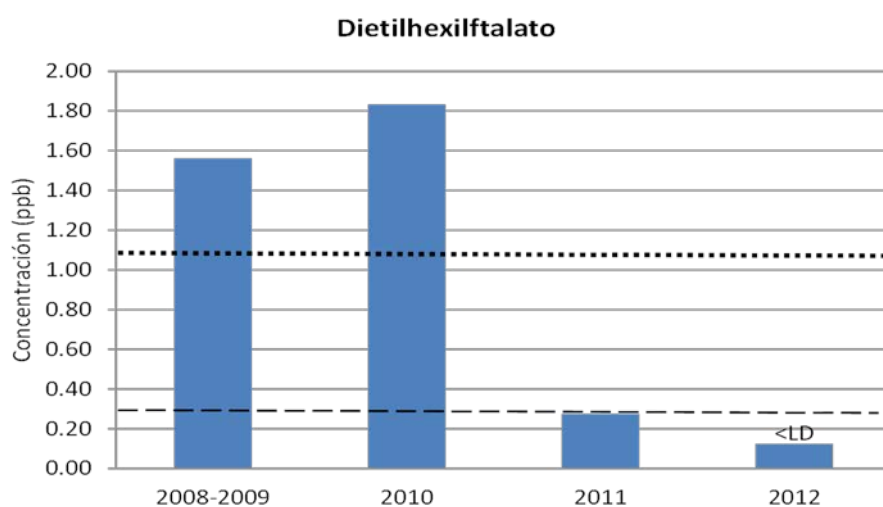


Figura 80. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 010 (···NCA-MA; --- LD)

• *Masa 0102*

Durante el control de vigilancia sólo el tributilo de estaño incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua. La Figura 81 muestra la evolución de los valores medios anuales obtenidos para este compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El tributilo de estaño alcanzó en el control de vigilancia de 2008-2009, una concentración media de 0.0065 µg/L, muy superior a la NCA-MA establecida para este compuesto (0.0002 µg/L). Posteriormente en 2010, la concentración media de este compuesto se redujo hasta valores de 0.002 µg/L, pero aun superando la NCA-MA. En 2011, la concentración media de este compuesto se incrementó de nuevo hasta valores de 0.0027 µg/L, que superaban de nuevo la NCA-MA. Finalmente, en 2012 se obtuvo una concentración inferior a las obtenidas en años anteriores, del orden de 0.0005 µg/L, aunque todavía por encima de la NCA-MA.

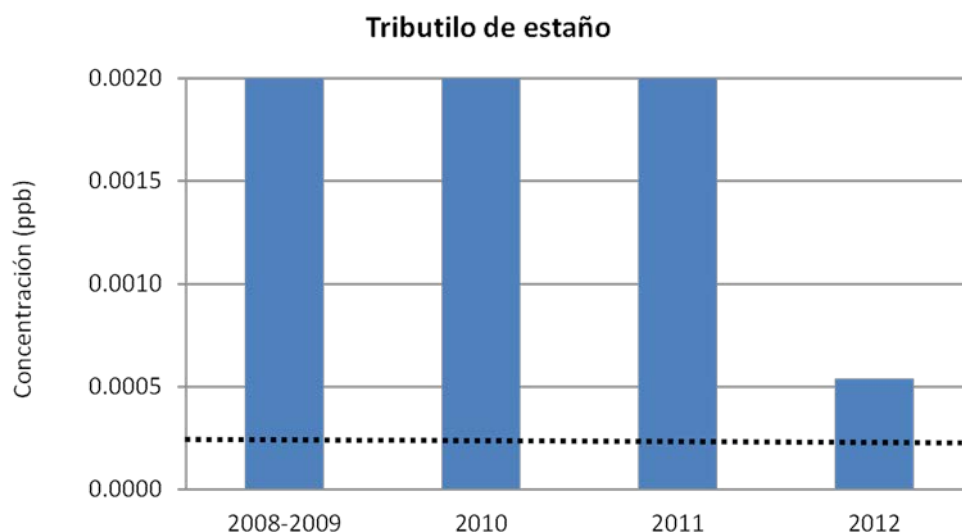


Figura 81. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 0102 (---NCA-MA; --- LD)

• *Masa 014*

Durante el control de vigilancia sólo el dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua. La 0 muestra la evolución de los valores medios anuales obtenidos para este compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 µg/L) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, alcanzando una concentración media de (5.0 µg/L). En el siguiente muestreo, realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue de 1.4 µg/L, superando así de nuevo la NCA-MA. Posteriormente, en los muestreos de 2011 y 2012 la concentración media de este compuesto se redujo hasta 0.3 µg/L y 0.2 µg/L, respectivamente, inferior a la NCA-MA.

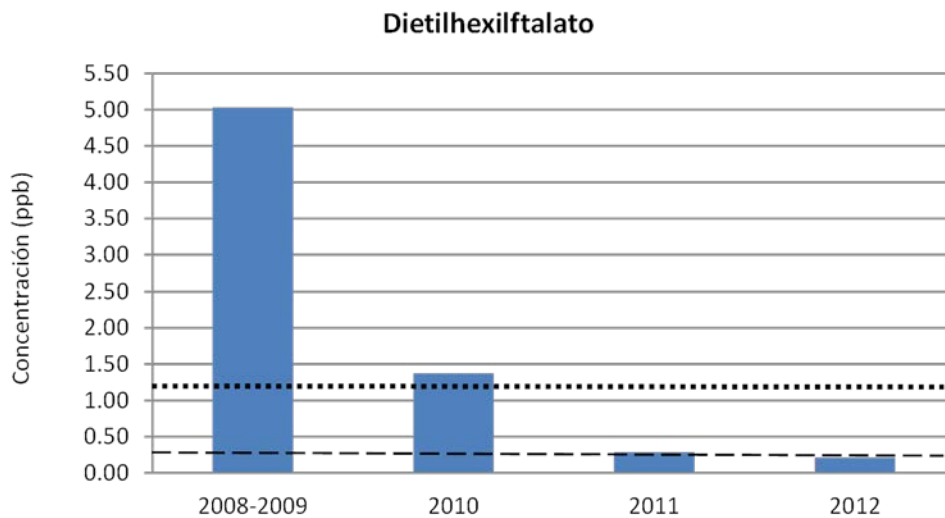


Figura 82. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 014 (···NCA-MA; --- LD)

• Masa 016

Durante el control de vigilancia sólo el dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA en toda la masa de agua. La 0 muestra la evolución de los valores medios anuales obtenidos para este compuesto a lo largo de los cuatro años de seguimiento.

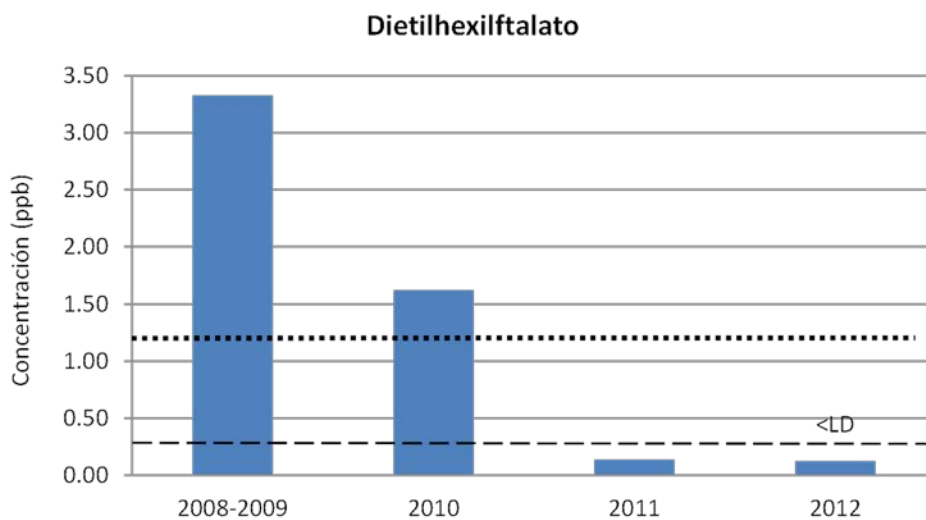


Figura 83. Concentraciones medias anuales de las sustancias prioritarias que superaron NCA en la masa 016 (···NCA-MA; --- LD)

El dietilhexilftalato incumplió la NCA-MA (1.3 $\mu\text{g/L}$) en el control de vigilancia realizado en 2008-2009, alcanzando una concentración media de (3.3 $\mu\text{g/L}$). En el siguiente muestreo, realizado en 2010, la concentración media alcanzada fue de 1.6 $\mu\text{g/L}$, superando así de nuevo la NCA-MA. Posteriormente, en los muestreos de 2011 y de 2012 no se detectó este compuesto en ninguna de las muestras analizadas.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, para todos los compuestos se ha observado una clara disminución en las concentraciones detectadas en las diferentes campañas. Esta tendencia puede ser debida a la reducción del uso de estos compuestos, ya que como se ha comentado en el punto 1.3 estas sustancias han sido prohibidas o restringidas en los últimos años.

Por otro lado, debido a la situación económica, la industrialización ha descendido en los últimos años notablemente, por lo que es posible que este hecho se haya reflejado en los resultados mostrándose un claro descenso en las emisiones de vertidos y, por consiguiente, en las emisiones de contaminantes.

5.1.2.3 Estado químico de las aguas costeras

En la Tabla 34 se muestran la evolución del estado químico de las aguas costeras que no cumplían las NCA. Como se puede observar las masas durante el período de control operativo, en general, las masas afectadas mejoraron su estado químico. Las masas 003 y 004, que no cumplieron los criterios de calidad durante el control de vigilancia por la presencia de dietilhexilftalato y pentaclorobenceno, presentaron un buen estado químico durante todo el control operativo. El resto de masas, que también estaban afectadas por la presencia de dietilhexilftalato y pentaclorobenceno, mejoraron su estado para el muestreo de 2011. Destaca la masa 0102, que no superó los criterios de calidad durante el control de vigilancia debido a elevadas concentraciones de TBT, y que continuó presentando un mal estado durante el control operativo debido a esta sustancia.

Tabla 34. Estado químico de las aguas costeras

Masa	Control Vigilancia	Control Operativo		
	2008-2009	2010	2011	2012
001	Malo	Malo	Malo	Bueno
003	Malo	Bueno	Bueno	Bueno
004	Malo	Bueno	Bueno	Bueno
0041	Malo	Malo	Bueno	Bueno
006	Malo	Malo	Bueno	Bueno
008	Malo	Malo	Bueno	Bueno
0081	Malo	Malo	Bueno	Bueno
010	Malo	Malo	Bueno	Bueno
014	Malo	Malo	Bueno	Bueno
016	Malo	Malo	Bueno	Bueno
0102	Malo	Malo	Malo	Malo

5.2 MUESTRAS DE BIOTA

Tal y como se ha comentado, las campañas anuales de muestreo realizadas en 2006, 2007 y 2008 permitieron obtener la información necesaria para evaluar las masas más afectadas y los contaminantes con mayor presencia en la biota. Estas campañas constituirían el control de vigilancia establecido en la Directiva 2000/60/CE para la matriz biota.

En 2010 se llevó a cabo una nueva campaña de muestreo analizando únicamente las masas con mayor presencia de contaminantes en la biota. Los trabajos realizados en 2010 constituirían el control operativo para la biota.

En cuanto a las NCA para biota, como ya se ha comentado en el punto 1.2.3, la Directiva 2008/105/CE sólo establece valores para algunas sustancias prioritarias: el hexaclorobenceno (10 µg/kg peso húmedo), el hexaclorobutadieno (55 µg/kg peso húmedo) y el mercurio (20 µg/kg peso húmedo). Por otra parte, el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión Europea de 19 de diciembre de 2006, así como el Reglamento (CE) Nº 208/2005 de la Comisión Europea de 4 de febrero de 2005 regulan el contenido máximo de hidrocarburos policíclicos aromáticos en bivalvos destinados al consumo humano, fijando un valor máximo de 10 µg/kg (peso húmedo) para el benzo(a)pireno. Para el resto de sustancias prioritarias no existen valores regulados.

5.2.1 CONTROL DE VIGILANCIA (2006-2007-2008)

En las campañas de 2006, 2007 y 2008 los resultados de sustancias prioritarias obtenidos en las muestras de biota permitieron determinar el grado de contaminación de las distintas zonas del litoral, así como observar la tendencia de algunas sustancias a acumularse en los tejidos de estos organismos.

En principio se planificó la toma de muestras en un total de aproximadamente 50 estaciones de muestreo distribuidas en las 24 masas de agua en las que se subdivide el litoral de la Comunidad Valenciana, recogiendo tanto ejemplares de mejillones como de tellinas. Sin embargo, en algunas de las masas de agua, bien por sus características geográficas (ej. ausencia de tellinas en playas rocosas) o bien por la abundante extracción de bivalvos por pescadores, fue imposible tomar suficiente cantidad de bivalvos para completar una muestra representativa. Esto hizo que únicamente se obtuviesen datos en 14 masas de agua.

En 2006 y 2007 los compuestos analizados en biota fueron fenoles (t-nonilfenol y octilfenol) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, antraceno, fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)antraceno).

Como ya se ha comentado, la Directiva 2008/105/CE estableció una serie de familias de compuestos con capacidad para acumularse en la biota y los sedimentos (pesticidas organoclorados, cloroalcanos, tributilo de estaño y difenil-éteres-bromados). De ahí, su importancia de monitorizarlos en bivalvos. Por tanto, para el muestreo realizado en 2008 los compuestos analizados en biota fueron: fenoles (t-nonilfenol, 4-nonilfenol, octilfenol); hidrocarburos aromáticos policíclicos o HAP (benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, antraceno, fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)antraceno); pesticidas organoclorados (hexaclorobenceno, hexaclorobutadieno, hexaclorociclohexano y pentaclorobenceno); cloroalcanos; tributilo de estaño; y difenil-éteres-bromados (BDE).

Los siguientes gráficos muestran los resultados obtenidos en el control de vigilancia realizado a la biota del litoral de la Comunidad Valenciana.

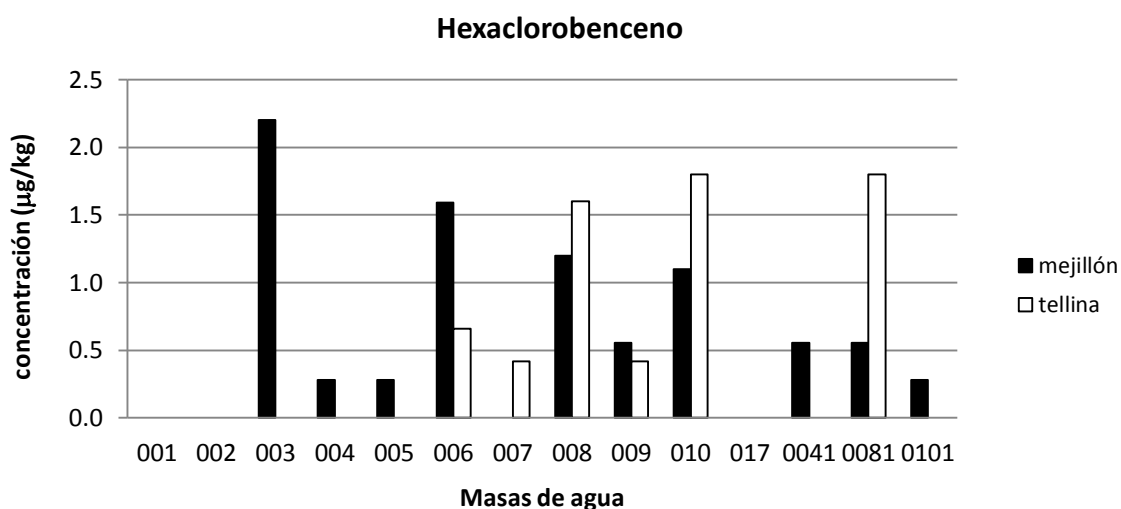


Figura 84. Concentraciones de Hexaclorobenceno en mejillones y tellinas en 2008

En la Figura 84 se puede observar los resultados obtenidos durante el muestreo de 2008 para mejillón y tellinas para el hexaclorobenceno. En general, en las masas afectadas se observa la presencia de este contaminante tanto en mejillón como en tellinas. Aunque la concentración detectada en la zona 003 es superior a la observada en el resto de zonas, en ninguna de las masas se supera la NCA recomendada (10 µg/kg).

La Figura 85 muestra las concentraciones de hexaclorociclohexano durante el muestreo de 2008. Las zonas 003, 004 y 0041 (próximas a Castellón) se ven afectadas por la presencia de este contaminante en mejillón, mientras que las zonas afectadas para tellinas son 008, 009 y 010 (próximas a Valencia). En general, las concentraciones detectadas son del orden del límite de detección en todas las zonas.

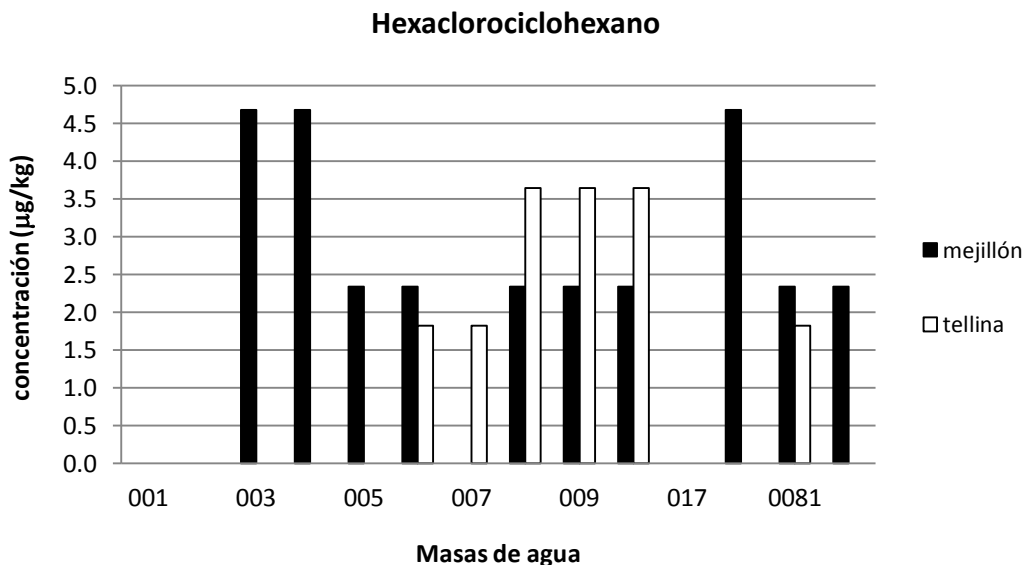


Figura 85. Concentraciones de hexaclorociclohexano en mejillones y tellinas en 2008

Como muestra la Figura 86 la presencia de hexaclorobutadieno en mejillón sólo se observa en dos zonas por encima del límite de detección frente a las cinco zonas en las que se detecta la presencia en tellinas. No obstante, todas las muestras presentan concentraciones menores a la NCA recomendada para este compuesto (55 µg/kg).

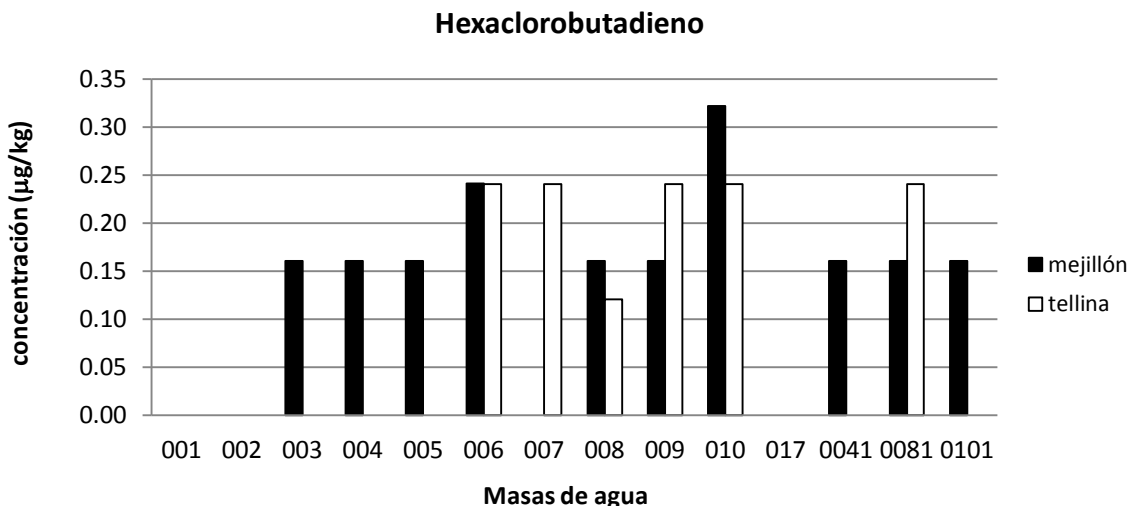


Figura 86. Concentraciones de hexaclorobutadieno en mejillones y tellinas en 2008

Como se puede observar en la Figura 87 sólo se detecta BDE por encima del límite de detección en 007, en muestra de tellina. Destaca para este compuesto que sea en tellina donde

mayor concentración se detecte, no observándose concentraciones mayores al límite de detección en mejillón.

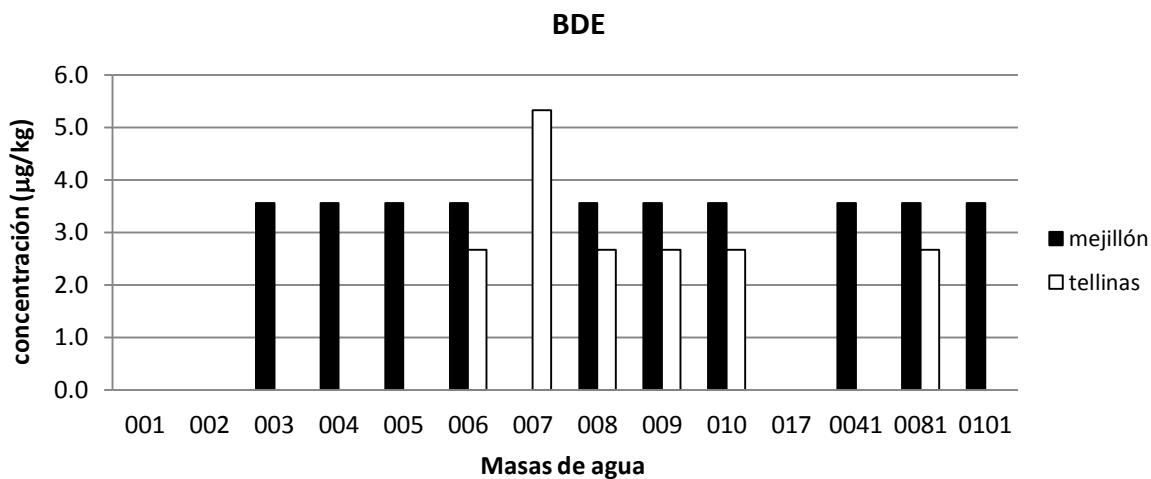


Figura 87. Concentraciones de difenil-éteres-bromados (BDE) en mejillones y tellinas en 2008

En la Figura 88 se observa la presencia de pentaclorobenceno en la mayoría de las masas estudiadas, especialmente en muestras de mejillón, frente a dos muestras de tellina afectadas, zona 006 y 010. En rasgos generales, se han detectado mayores concentraciones en mejillón que en tellina pero destacan dos zonas, 005 y 009, por la elevada presencia de éste contaminante.

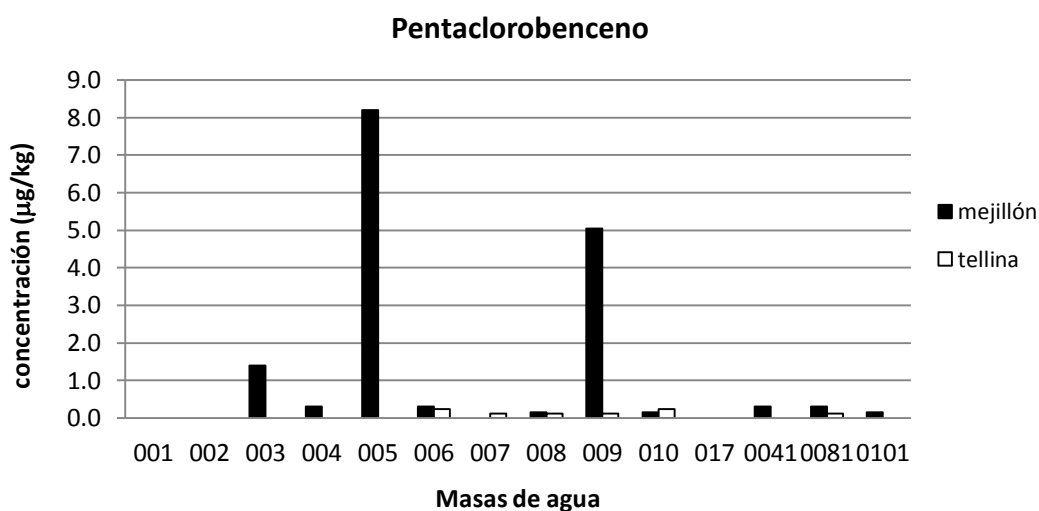


Figura 88. Concentraciones de pentaclorobenceno en mejillones y tellinas en 2008

La Figura 89 muestra los resultados observados para el tributilo de estaño en muestras de bivalvos. Como era de esperar la presencia de este compuesto, ya que su principal uso es en barnices antiincrustantes para barcos, se ve favorecida en zonas próximas a puertos como son

las zonas 0041,0081 y 0101. Además, se observan elevadas concentraciones de este contaminante en zonas próximas a las anteriormente citadas, lo cual podría deberse a su desplazamiento con las corrientes marinas.

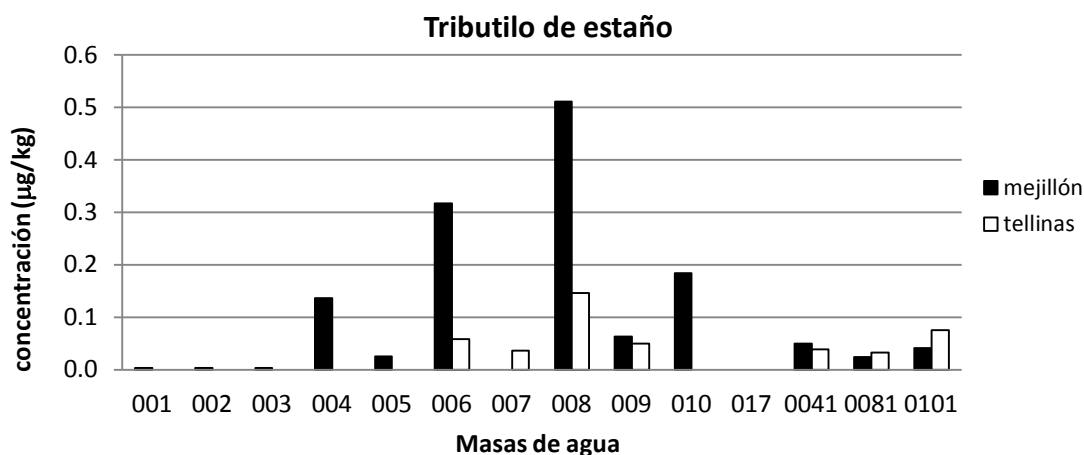


Figura 89. Concentraciones de tributilo de estaño en mejillones y tellinas en 2008

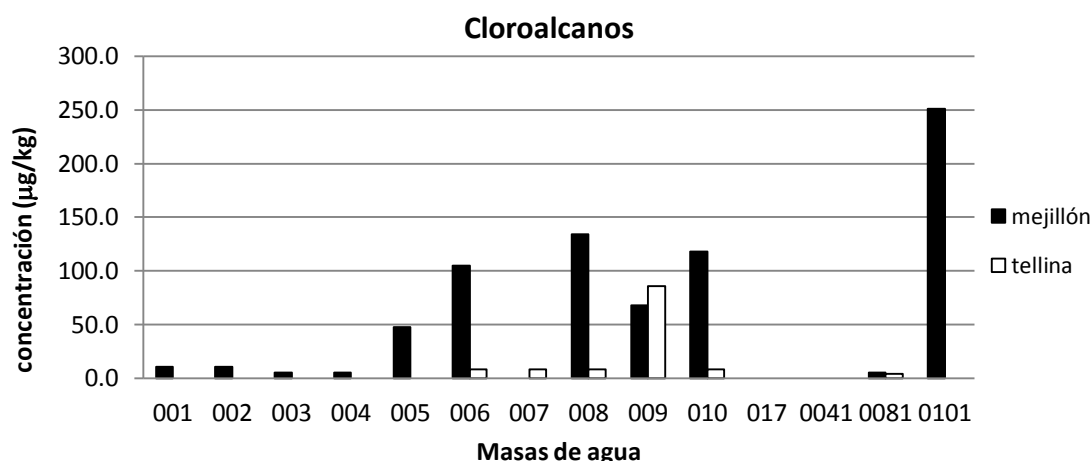


Figura 90. Concentraciones de cloroalcanos en mejillones y tellinas en 2008

Como se puede ver en la Figura 90 tanto tellinas como mejillones muestran contaminación en diferentes zonas a lo largo de la costa de la Comunidad Valenciana, acentuándose dicha contaminación en las zonas más próximas a grandes ciudades. Destaca la elevada concentración en la zona 0101, que corresponde a una masa de agua muy modificada por cercanía a una zona portuaria.

En el caso de dietilhexilftalato, se observó su presencia (Figura 91) en todas las masas al límite de detección, únicamente en muestras de tellina se detectó por encima de este valor en la mayor parte de las masas estudiadas.

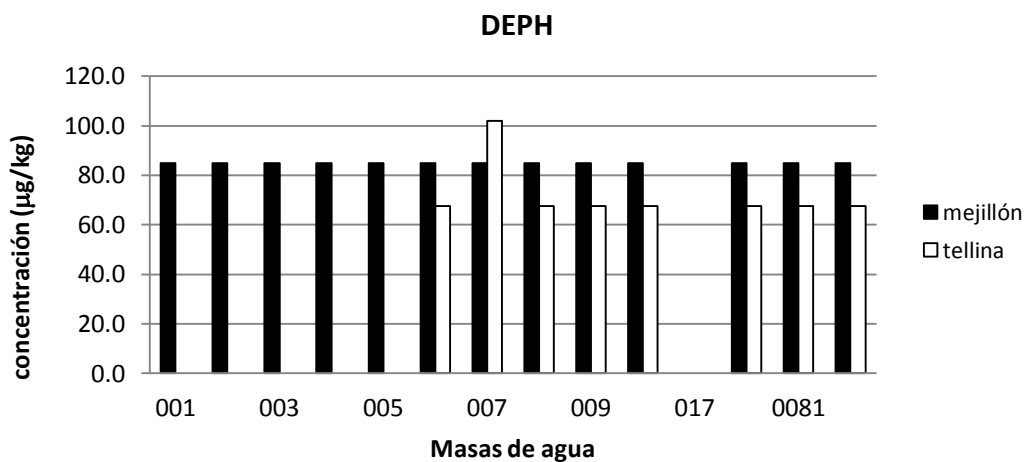


Figura 91. Concentraciones de DEHP en mejillones y tellinas en 2008

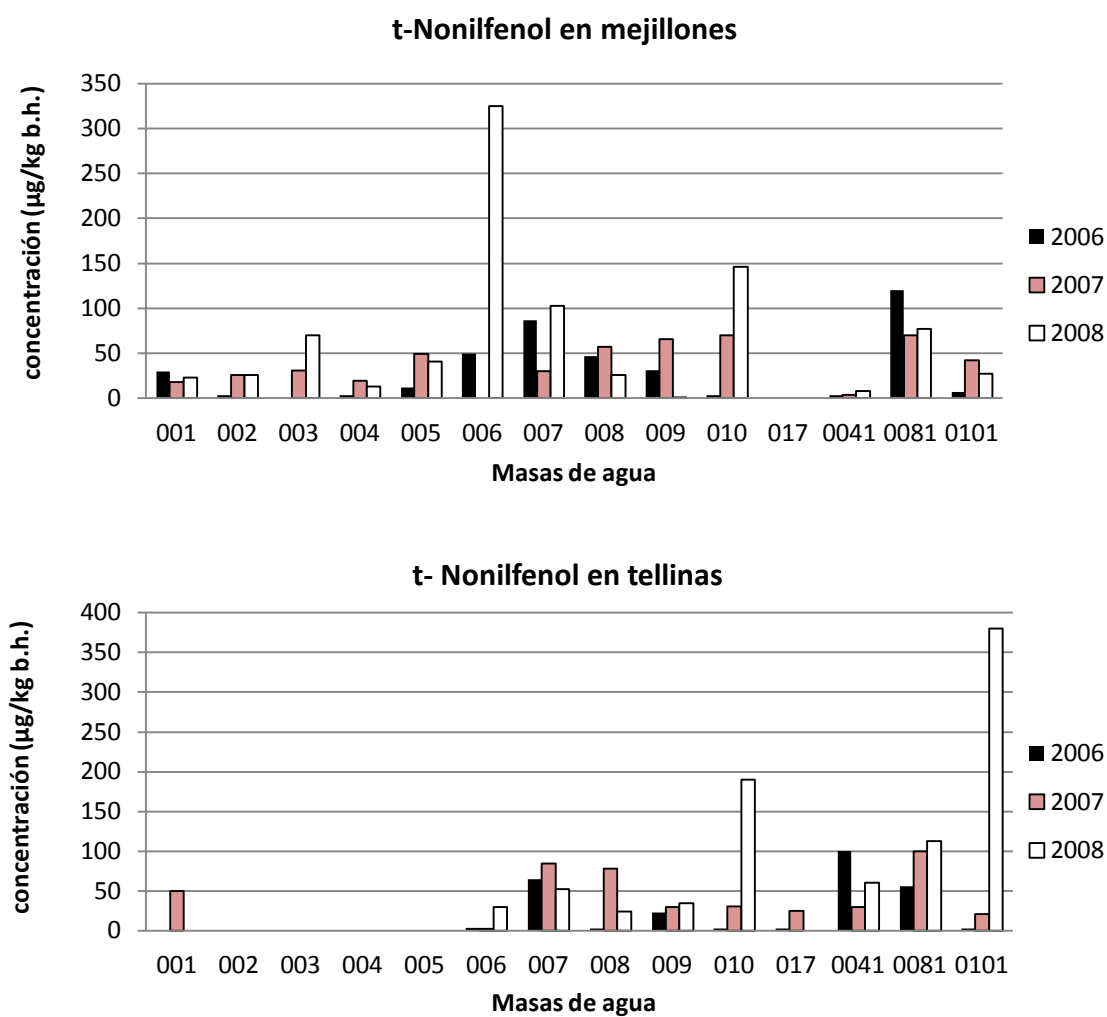


Figura 92. Concentraciones de t-nonilfenol en mejillones y tellinas en 2006-2007-2008

Los resultados representados en la Figura 92 reflejan una presencia generalizada de t-nonilfenol en mejillones, para las tres campañas estudiadas. Cabe destacar la elevada concentración detectada en la masa 006 para mejillones y la masa 0101 para tellinas, ambos resultados de la campaña de 2008. Sin embargo, se puede observar que en general las zonas afectadas están próximas a zonas de mayor carga industrial o a zonas próximas a puertos.

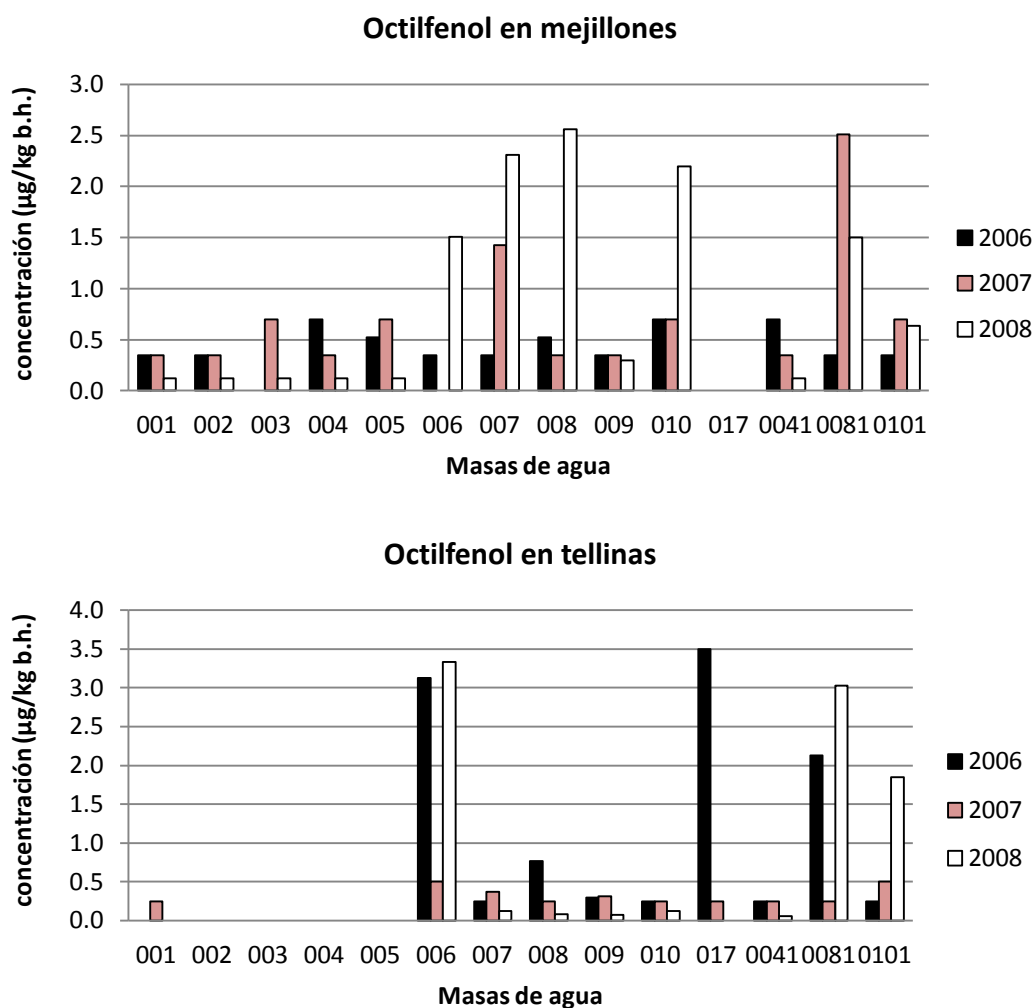


Figura 93. Concentraciones de octilfenol en mejillones y tellinas en 2006-2007-2008

Los resultados obtenidos de octilfenol (Figura 93) indican una presencia generalizada de este contaminante en todas las masas de agua para mejillón, observándose aumento en las concentraciones de algunas masas (006, 007, 008 y 010) y una ligera disminución en masas como 004 o 0041. En tellinas se observa una disminución en las concentraciones salvo para las zonas 006, 0081 y 0101. Al igual que para t-nonilfenol, se observa una mayor presencia de octilfenol en áreas próximas a zonas de elevada carga industrial o zonas próximas a puertos.

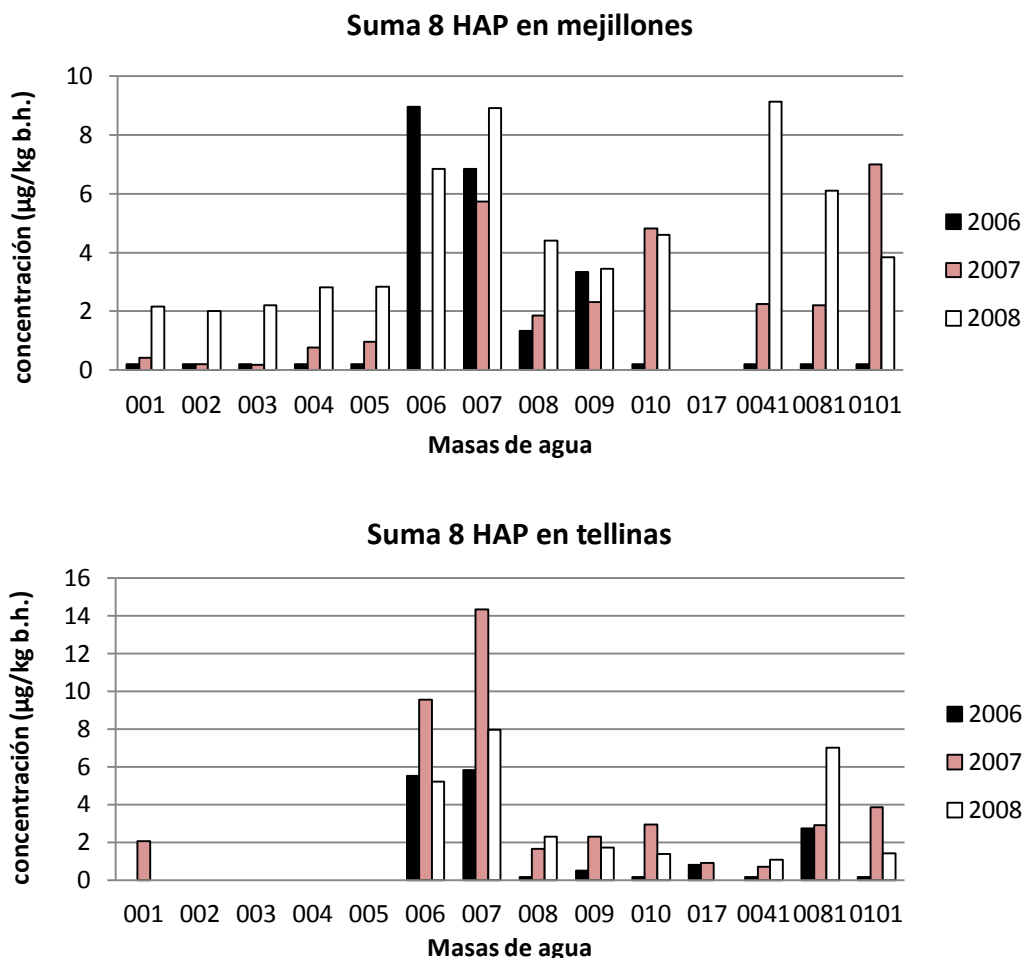


Figura 94. Concentraciones de HAP en mejillones y tellinas en 2006-2007-2008

En la Figura 94 se puede observar un incremento en la concentración de HAP en los bivalvos de las masas 007, 008, 010, 041 y 0081. Siendo generalizada la presencia de estos contaminantes en mejillones. Destaca la elevada concentración detectada en tellinas, especialmente en la masa 007 donde la NCA (10 µg/kg) se ve superada.

Por tanto, a partir de la tendencia ascendente observada en las concentraciones de t-nonilfenol, octilfenol y HAP medidas en biota entre 2006 y 2008, y dada la toxicidad y persistencia de estos compuestos, sería recomendable la realización de futuros muestreos para evaluar su evolución a largo plazo tal y como recomienda la Directiva Marco del Agua.

5.2.1.1 Análisis estadístico multivariante

A la vista de los resultados obtenidos en el control de vigilancia, t-nonilfenol, octilfenol y HAP fueron los compuestos detectados en mayor número de muestras y a mayores concentraciones tanto en mejillones como en tellinas. Por ello, se analizaron los resultados

obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA). La matriz de datos se componía de las concentraciones medias obtenidas de dichos compuestos para los tres años analizados, diferenciando entre tellinas y mejillones.

En el modelo PCA construido tras preprocesar los datos (centrando los datos y escalando a varianza unitaria) se retuvieron las dos primeras componentes principales que explicaban un 67.3% y 11.5% de la varianza de los datos, respectivamente. Los resultados del modelo PCA obtenido se presentan gráficamente en la Figura 95 (a) y (c). La Figura 95 (a) muestra cómo se relacionan los mejillones o tellinas de una determinada masa entre ellas en relación a las concentraciones de sustancias prioritarias encontradas (por ejemplo, mejillones o tellinas similares en cuanto a la detección de prioritarias, se encuentran juntas en el gráfico). El gráfico de los pesos (Figura 95 (c)) muestra la relación entre las variables e indica qué variables son responsables del patrón observado en el gráfico Figura 95 (a).

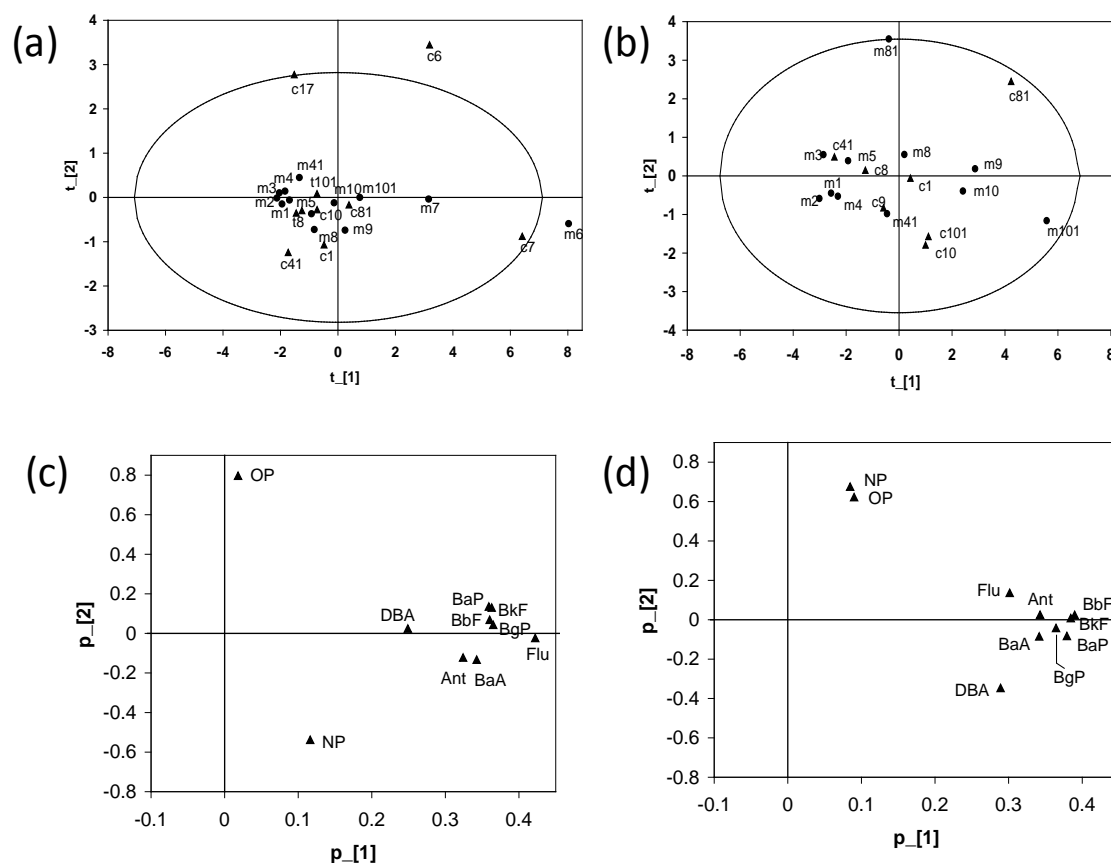


Figura 95. (a), (c) componentes principales retenidas y pesos de las variables incluyendo todas las áreas (b), (d) componentes principales retenidas y pesos de las variables excluyendo masas 006, 007 y 017. Abreviaturas usadas: En gráficos (a) y (b): c (tellinas) y m (mejillones) acompañados del número de masa. En gráficos (c) y (d): OP: octilfenol; NP: nonilfenol; Ant: antraceno; BaP: benzo(a)pireno; BgP: benzo(g,h,i)perileno; BbF: benzo(b)fluoranteno, BkF: benzo(k)fluoranteno; DBA: dibenzo(a,h)antraceno; Flu: fluoranteno; BaA: benzo(a)antraceno.

Observando ambos gráficos se pueden concluir que:

- La primera componente está relacionada fundamentalmente con los HAP, exhibiendo todos ellos una clara correlación positiva. Esto indica que aquellas áreas contaminadas por HAP, presentan todas ellas un gran número de dichos compuestos.
- La segunda componente contiene la información relacionada con los fenoles.
- En la Figura 95 (a) se observa claramente que las masas 006 y 007 (ambas correspondientes a la zona norte de la ciudad de Valencia) y la masa 017 (en el sur de la Comunidad Valenciana) se encuentran separadas del resto. Observando la Figura 95 (c) se puede explicar esta separación por la elevada concentración de HAP encontrada en los bivalvos de las masas 006 y por la elevada concentración de octilfenol en los bivalvos de la masa 017 con respecto al resto.

Con el fin de analizar mejor los datos, se realizó un nuevo PCA excluyendo las áreas 006, 007 y 017. En este caso, se retuvieron las dos primeras componentes principales que explicaban un 62.7% y 17.2% de la varianza de los datos, respectivamente. Las principales conclusiones extraídas de este segundo PCA son:

- El gráfico Figura 95 (d) muestra, de nuevo, que la primera componente está claramente relacionada con los HAP mientras que la segunda se relaciona con los fenoles.
- La masa 0081 (puerto de Valencia) se aleja del resto debido a una mayor presencia de fenoles en los bivalvos, mientras que las masas 009, 010 y 0101 se alejan del resto debido a una mayor presencia de HAP.

5.2.1.2 Estudio de la distribución de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) constituyen una categoría abundante de contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente. Su presencia ha sido generalizada en todas las masas de agua y a elevadas concentraciones, incluso por encima de la NCA. Con el fin de estudiar de qué origen eran los HAP presentes en el litoral de la Comunidad Valenciana, se analizaron los resultados obtenidos en una de las masas de agua cuyos bivalvos presentaban mayor contaminación por HAP, concretamente la masa 007 (ver Figura 94). Para ello, se calculó para cada bivalvo la concentración relativa de HAP, como el cociente entre la concentración de cada HAP y la suma de las concentraciones de los 8 HAP analizados ($HAP_i/\Sigma HAP$). En la Figura 96(a) se muestra para mejillones y tellinas la concentración relativa de los 8 HAP analizados, incluyendo su peso molecular y su constante octanol-agua (Kow).

Tal y como se observa, los dos compuestos de mayor peso molecular (Dibenzo(a,h)antraceno (DBA) (penta-aromático) y Benzo(g,h,i)perileno (BgP) (hexa-aromático), que además son los que presentan el mayor Kow, se acumulan mayoritariamente en tellinas que en mejillones. Estos compuestos más pesados tienen mayor afinidad con la materia particulada y acaban así formando parte del sedimento. Dado que las tellinas se localizan cerca del sedimento están mucho más expuestas a estos HAP de elevado peso molecular que los mejillones que se localizan en la interfase aire-agua. Sin embargo, esta misma tendencia no se observa en el resto de compuestos penta-aromáticos (BaP, BbF, BkF) que se acumulan en ambos bivalvos en similares proporciones. En cuanto a los compuestos tetra-aromáticos (Flu y BaA), que son más solubles y por tanto se encuentran presentes en la columna de agua, se encuentran de forma más abundante en mejillones. Finalmente, el único compuesto tri-aromático analizado (Antraceno) ha sido detectado en bajas y similares concentraciones en ambos bivalvos.

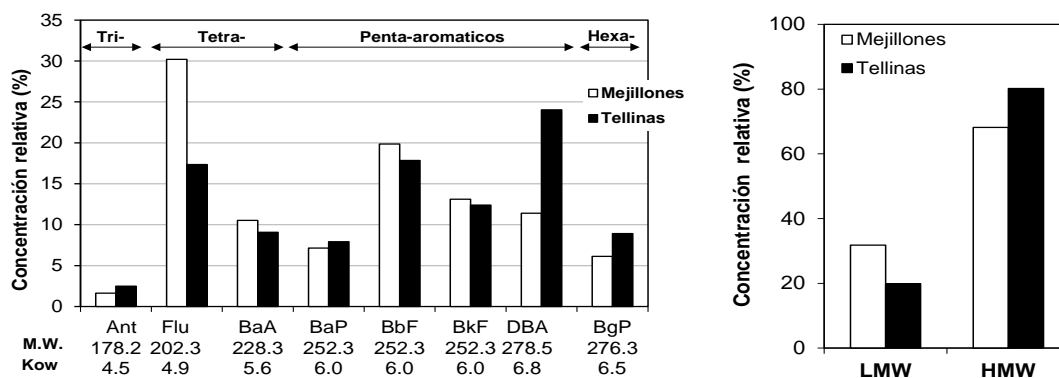


Figura 96. (a) Concentración relativa de cada HAP en bivalvos de la masa 007 (b) Concentración relativa de HAP de elevado (HMW) y bajo peso molecular (LMW)

Con el fin de averiguar la fuente principal de contaminación por HAP (pirolítica o petrogénica), los resultados de la Figura 96(a) han sido agrupados en HAP de elevado peso molecular y bajo peso molecular (HMW y LMW). La Figura 96(b) muestra la abundancia relativa de cada grupo, expresada como el cociente entre la suma de los HAP con LMW o HMW y la suma total de HAP para la masa 007. Tal y como se ha comentado anteriormente, los HAP de origen petrogénico se caracterizan por tener bajo peso molecular (compuestos de hasta 4 anillos aromáticos) mientras que los HAP de origen pirolítico corresponden a los de mayor peso molecular (compuestos de 4, 5 y 6 anillos aromáticos). Según se observa en la figura, aunque se han encontrado HAP procedentes de ambas fuentes de contaminación en la masa 007, abundan principalmente los compuestos de elevado peso molecular, procedentes de actividades pirolíticas.

Finalmente, para estudiar la abundancia relativa de cada HAP en todas las zonas muestreadas se ha llevado a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz

de datos formada por el cociente entre la concentración de cada HAP y la suma de las concentraciones de los 8 HAP analizados en cada zona ($HAP_i/\Sigma HAP$). En el modelo PCA construido tras preprocesar los datos (centrando los datos y escalando a varianza unitaria) se retuvieron las dos primeras componentes principales que explicaban un 48% y 19.8% de la varianza de los datos, respectivamente. Los resultados del modelo PCA obtenido se presentan gráficamente en la Figura 97. La relación que existe entre las distintas zonas muestreadas puede observarse en la Figura 97a. Zonas que están cercanas entre sí en este mapa son zonas que tienen características similares en cuanto a la distribución de los HAP en el tejido de los bivalvos de esas zonas. Los patrones que se observan en este mapa se pueden interpretar a partir de la Figura 97b, que muestra gráficamente cómo están relacionadas entre sí las distintas variables. Variables que están positivamente correlacionadas están agrupadas cerca (en el mismo cuadrante) mientras que si están inversamente correlacionadas están localizadas en cuadrantes opuestos respecto del origen del gráfico.

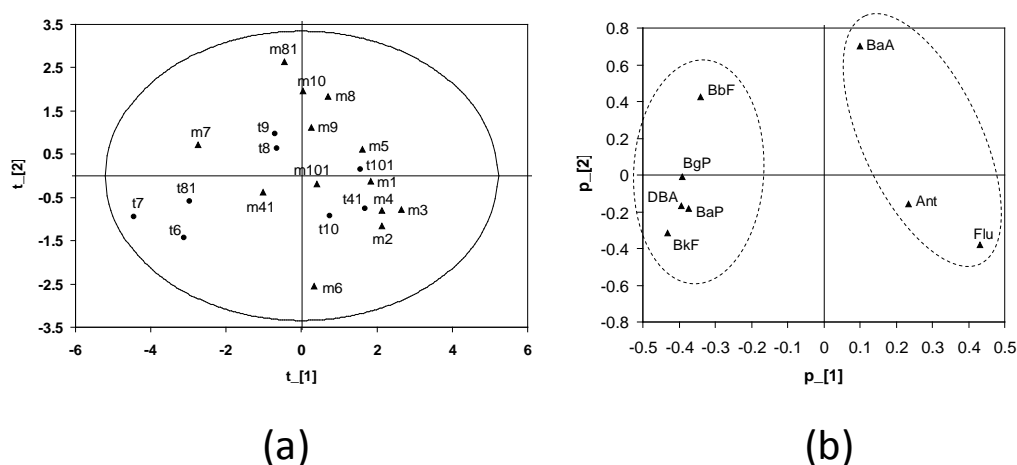


Figura 97. Resultados del modelo PCA: **(a)** Componentes principales retenidas **(b)** Pesos de las variables en la formación de las componentes principales. Abreviaturas usadas: "t" se refiere a tellinas, "m" a mejillones, y el número a la zona muestreada (ej., m6: mejillones de la zona 006). Las variables son: Ant: antraceno; BaP: benzo(a)pireno; BgP: benzo(g,h,i)perileno; BbF: benzo(b)fluoranteno, BkF: benzo(k)fluoranteno; DBA: dibenzo(a,h)antraceno; Flu: fluoranteno; BaA: benzo(a)antraceno.

Se puede observar claramente en la Figura 97b, que la primera variable latente separa los compuestos tri- y tetra-aromáticos de los penta- y hexa-aromáticos. Los compuestos de bajo peso molecular (Ant y Flu) quedan agrupados en el cuadrante inferior derecho, mientras que los compuestos de mayor peso molecular (BaP, BgP, BbF, BkF, DBA) están agrupados en los dos cuadrantes de la izquierda. El BaA, aunque es un compuesto tetra-aromático presenta un peso molecular próximo al de los compuestos penta-aromáticos, lo cual explica su posición intermedia entre ambos grupos.

Por tanto, a partir de Figura 97 es posible determinar el tipo de contaminación predominante en cada uno de los bivalvos estudiados. Así, se observa que en los bivalvos de la

zona 007 así como en las tellinas de las zonas 006 y 081, predominan los compuestos de elevado peso molecular respecto de los de bajo peso molecular, por lo que el origen de la contaminación por HAP en estas zonas estaría asociado a fuentes pirolíticas. Por otra parte, en los mejillones de las zonas 002, 003, 004 y en las tellinas de la zona 041, predominan claramente los HAP de bajo peso molecular, lo que indicaría que la principal fuente contaminante en estas zonas sería de origen petrogénico.

5.2.2 CONTROL OPERATIVO (2010)

Durante el período 2010 se realizó un seguimiento ordinario, a modo de control operativo, en las masas de agua donde se había observado una mayor presencia de contaminantes orgánicos en biota en años anteriores. En total se analizaron 7 masas de agua (3 masas de agua afectadas por puertos (0041, 0081, 0101) así como su entorno (004, 006, 007 y 010), con dos puntos de muestreo por masa, uno para mejillones y otro para tellinas. Cabe resaltar que en la masa 004 no hubo presencia de tellinas en el período muestreado. En estas 14 muestras se realizó la determinación de las sustancias prioritarias propensas a la acumulación en sedimentos y/o biota, según la Directiva 2008/105/CE de 16 de diciembre de 2008.

La Tabla 35 muestra un resumen de los resultados globales obtenidos en el control operativo de biota en el año 2010, indicando el porcentaje de zonas cuyas tellinas (T) o mejillones (M) aparecen afectadas por un determinado contaminante. A este porcentaje se le ha denominado frecuencia de aparición y se expresa como (% de zonas afectadas).

Tabla 35. *Resumen de los resultados de sustancias prioritarias en tellinas (T) y mejillones (M) en el control operativo de 2010.*

Compuestos	Nº masas detectados (T)	Nº masas cuantificado (T)	Nº masas detectado (M)	Nº masas cuantificado (M)	Frec. Aparición T (% zonas afectadas)	Frec. Aparición M (% zonas afectadas)
t-Nonilfenol	6	6	7	7	100	100
4-Nonilfenol	4	4	6	6	67	86
Octilfenol	1	1	3	3	17	43
Benzo(a)pireno	6	4	6	4	100	86
Benzo(b)fluoranteno	6	4	6	5	100	86
Benzo(ghi)perileno	1	1	2	2	17	29
Benzo(k)fluornateno	6	4	7	5	100	100
Indeno(1,2,3-cd)pireno	1	0	0	0	17	0
Antraceno	6	6	7	7	100	100
Fluornateno	4	2	6	4	67	86
Difeniléteres bromados	4	0	6	0	67	86
Clorocalcano	5	4	6	3	83	86
Dietilhexilftalato	0	0	1	0	0	14
Hexaclorobenceno	5	0	6	0	83	86
Hexaclorobutadieno	1	0	3	0	17	43
Hexaclorociclohexano	6	0	7	0	100	100
Pentaclorobenceno	3	1	7	1	50	100
Comp. Tributilo de estaño	3	0	5	2	50	71

Se observa una frecuencia de aparición superior al 50% de muchos de los compuestos analizados, tanto en tellinas como en mejillones: t-nonilfenol, 4-nonilfenol, la mayoría de HAP, difenil-éteres-bromados, cloroalcanos, hexaclorobenceno, hexaclorociclohexano, tributilo de estaño y pentaclorobenceno. Destaca la baja frecuencia de aparición del dietilhexilftalato, pese a ser uno de los compuestos más detectado en aguas costeras.

A continuación se presenta en forma de gráfico, la distribución temporal de cada uno de los compuestos analizados en tellinas y mejillones, a lo largo del control de vigilancia y operativo, en las 7 masas de aguas estudiadas durante el control operativo.

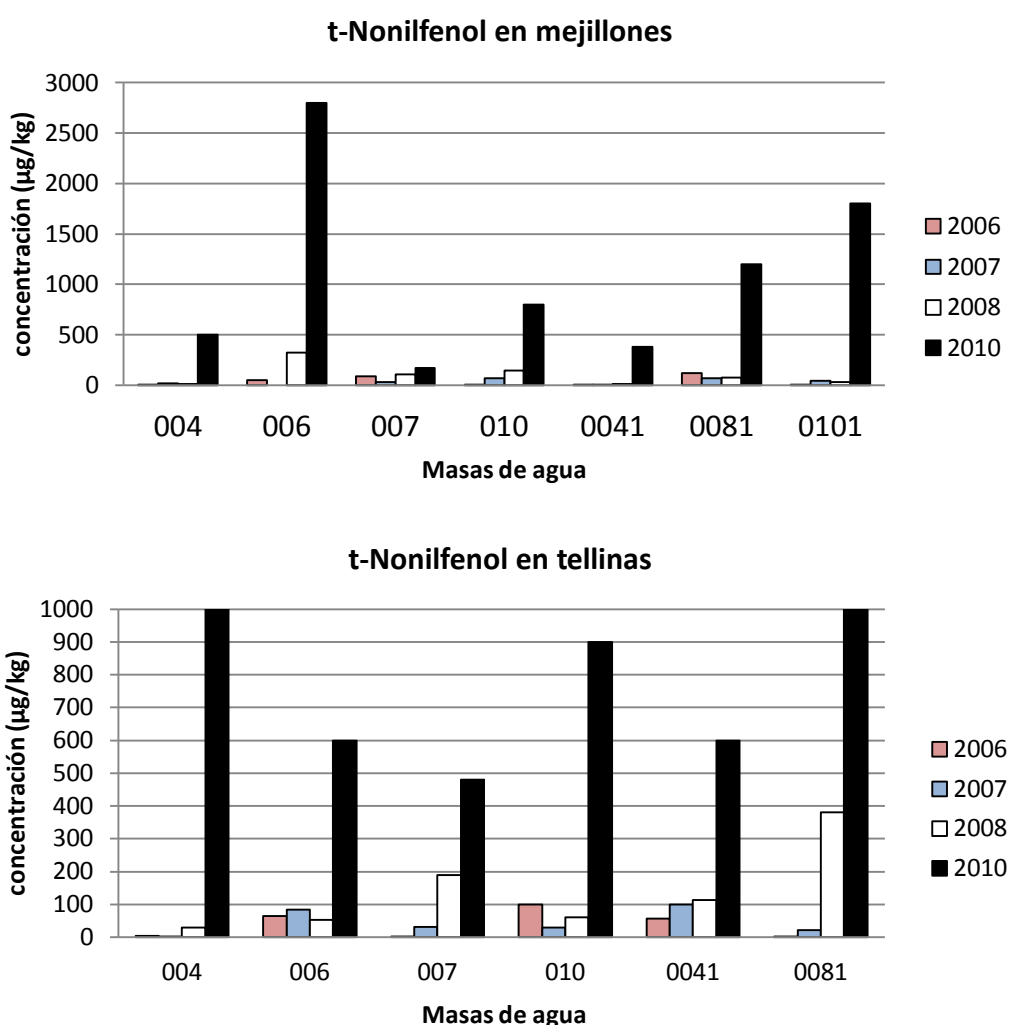


Figura 98. Concentraciones de t-nonilfenol en mejillones y tellinas (2006-2007-2008-2010)

En la Figura 98 se refleja un claro aumento en las concentraciones de t-nonilfenol detectadas en el año 2010, siendo la presencia de este contaminante generalizada, tanto en mejillón como en tellina. Siguiendo la misma tendencia observada hasta ahora, las

concentraciones más elevadas detectadas corresponden a muestras de mejillón. Sin embargo, como se puede observar en la figura, las concentraciones en algunas masas fueron superiores en tellina que en mejillón.

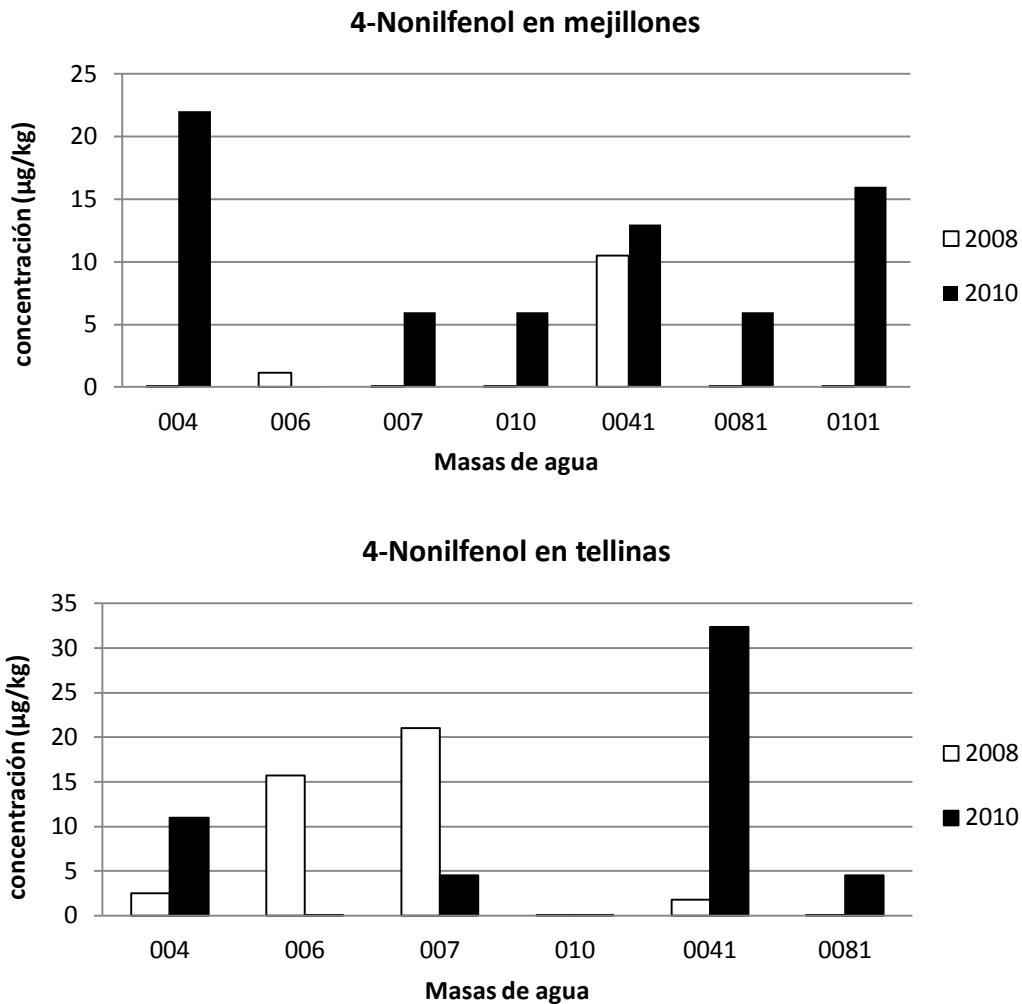


Figura 99. Concentraciones de 4-nonilfenol en mejillones y tellinas (2008-2010)

Para el 4-nonilfenol (Figura 99), al igual que se observaba para el t-nonilfenol, existe un aumento en las concentraciones detectadas en el control operativo (2010) especialmente en mejillones, pasando de ser detectado al límite de detección a concentraciones superiores a 20 mg/kg. Cabe destacar la elevada concentración detectada en tellinas, superior a las concentraciones detectadas en mejillón en las masas 006, 007 y 0041.

Al igual que para el t-nonilfenol se puede ver como la masa 0101 está afectada para mejillón y no para tellina. Esto es debido a la mayor contaminación del agua en contacto con las zonas rocosas, posiblemente debido a la presencia de la zona portuaria.

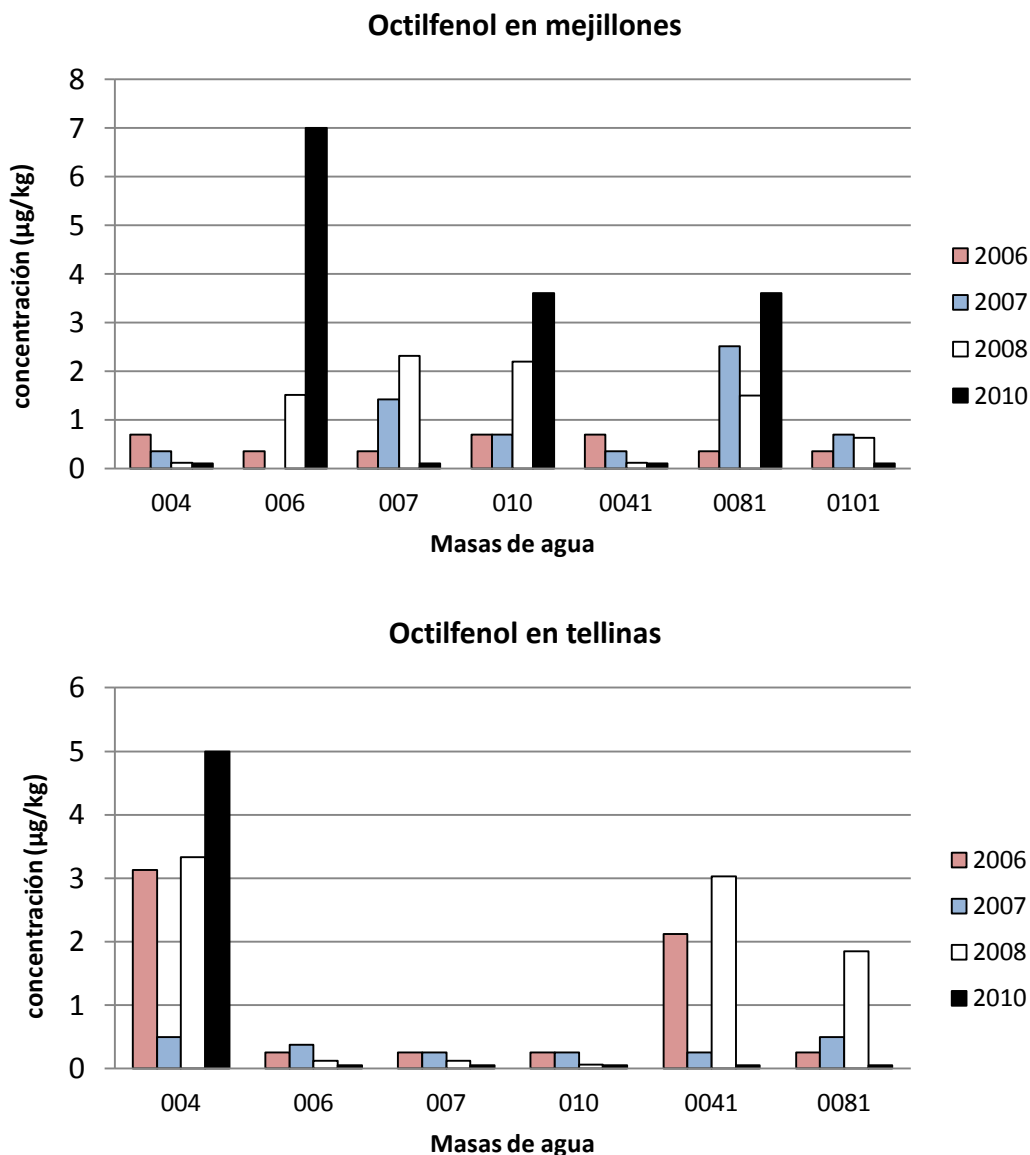


Figura 100. Concentraciones de octifenol en mejillones y tellinas (2006-2007-2008-2010)

En la Figura 100 se puede observar una mayor variabilidad en las concentraciones detectadas de octifenol en las masas de agua estudiadas. En las muestras de mejillón se ve una tendencia ascendente, especialmente en las masas 006, 010 y 0081. El comportamiento mostrado por este contaminante en tellinas y mejillón, que las zonas más afectadas para tellinas son las menos afectadas para mejillón, es muy diferente al observado para t-nonilfenol y 4-nonilfenol.

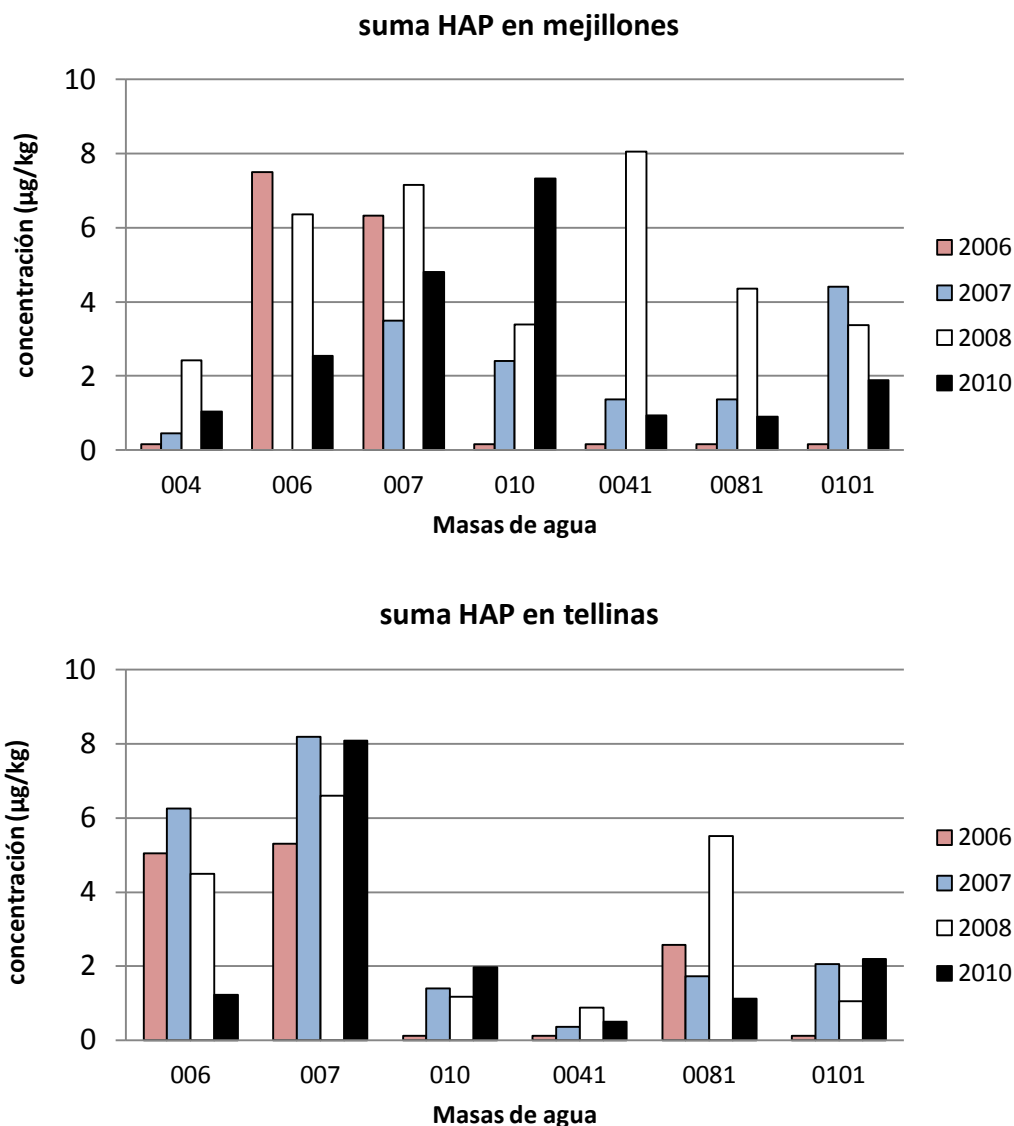


Figura 101. Concentraciones de HAP en mejillones y tellinas (2006-2007-2008-2010)

La presencia de HAP en muestras de mejillón y tellina está generalizada en las diferentes masas y diferentes muestreos como indica la Figura 101, algo que era de esperar ya que el uso de estos compuestos está ampliamente extendido. En general, las masas 006 y 007 son las más afectadas por estos contaminantes, pero con concentraciones por debajo de los valores recomendados por la legislación vigente para estos compuestos en bivalvos (10 µg/Kg).

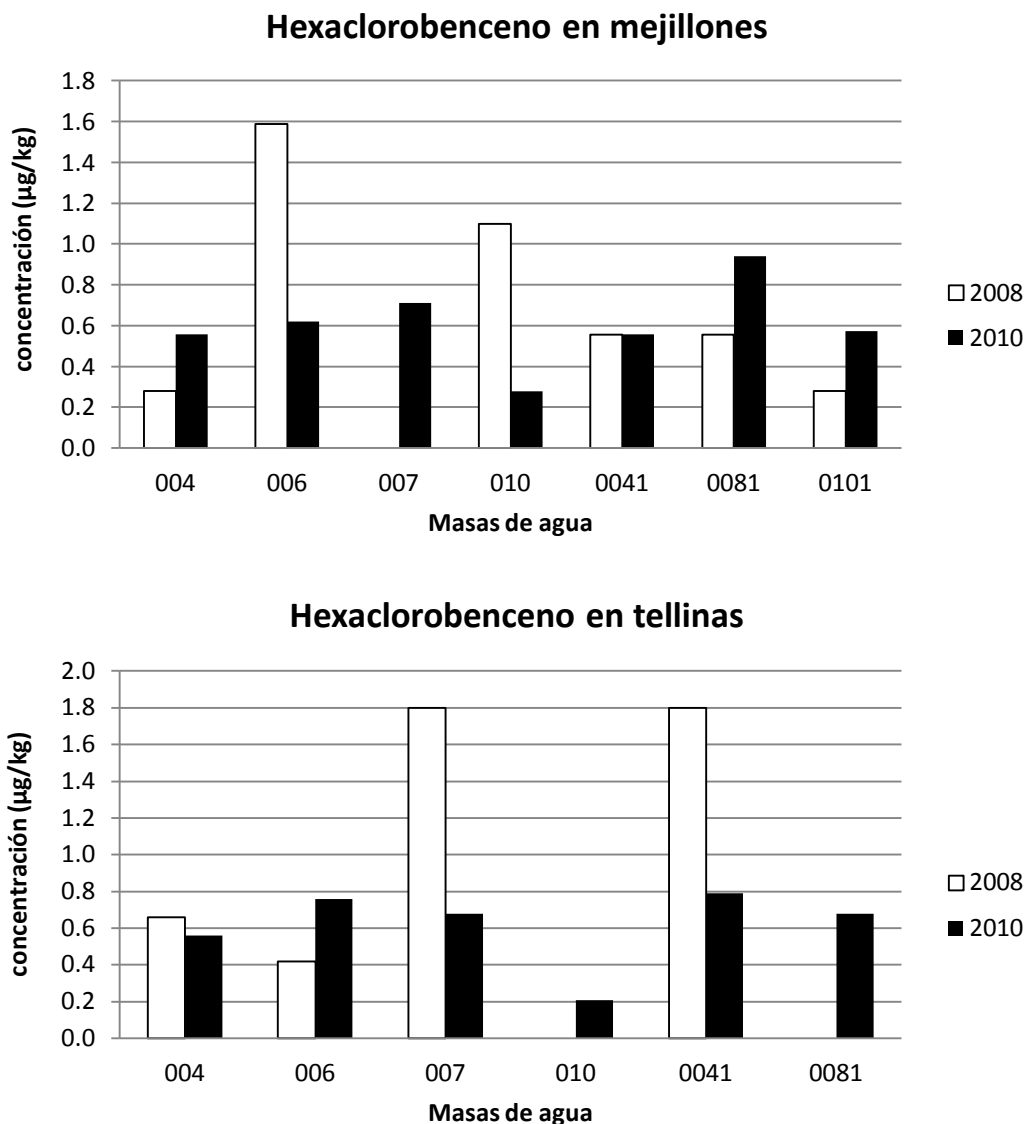


Figura 102. Concentraciones de hexaclorobenceno en mejillones y tellinas (2008-2010)

Como muestra la Figura 102 el hexaclorobenceno fue detectado en todas las masas tanto en mejillón como en tellina. Aunque las concentraciones detectadas en el control operativo (2010) fueron menores a las concentraciones detectadas en el control de vigilancia (2008), la presencia de este contaminante está más generalizada en el muestreo de 2010. En cualquier caso, ninguna muestra presenta concentraciones superiores los valores recomendados para este compuesto en bivalvos (10 µg/Kg).

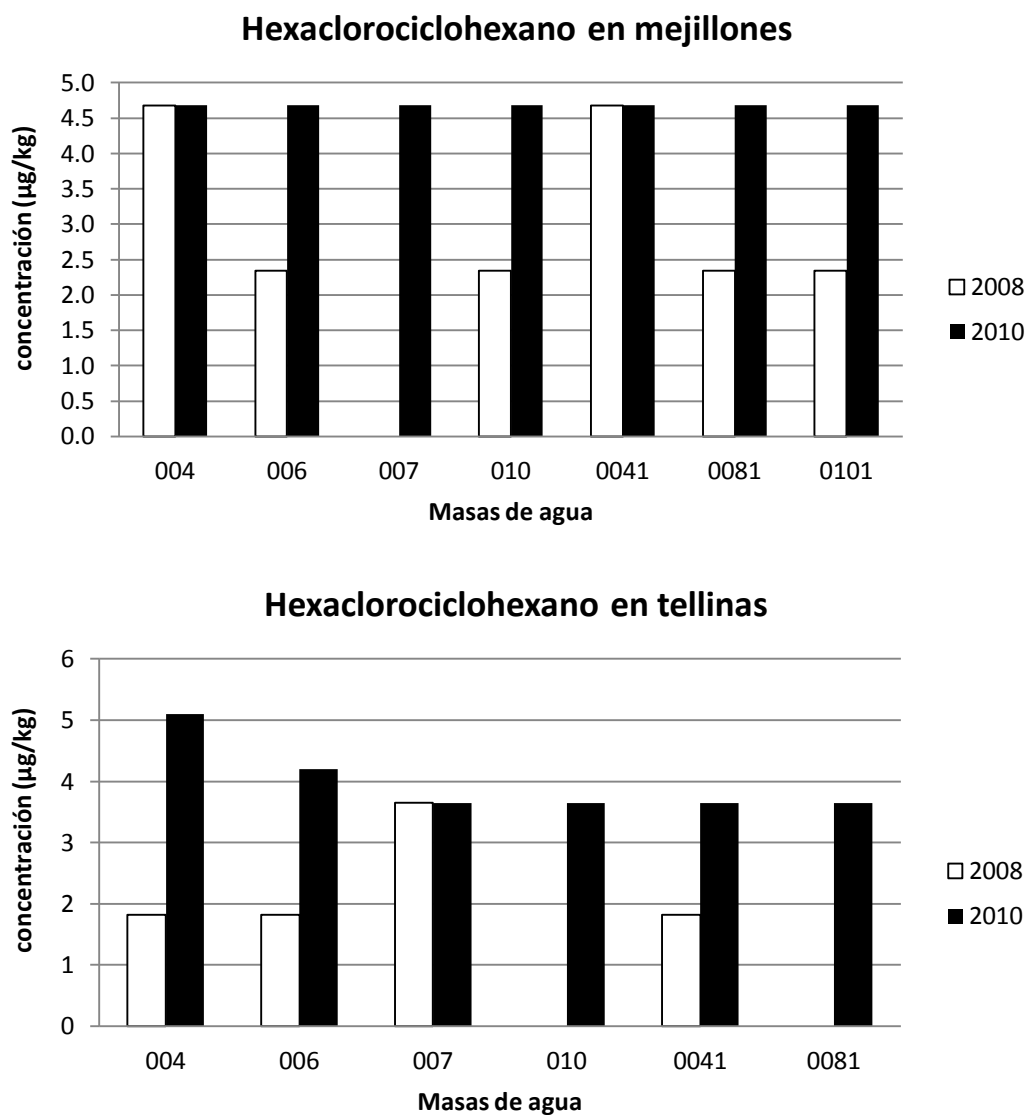


Figura 103. Concentraciones de hexaclorociclohexano en mejillones y tellinas (2008-2010)

Al igual que se observaba para el hexaclorobenceno, la presencia de hexaclorociclohexano está muy generalizada (Figura 103), siendo más frecuente esta sustancia en el control operativo (2010) que el control de vigilancia. Para este contaminante las concentraciones detectadas en mejillón son similares a las concentraciones detectadas en tellinas. Este hecho indica que para esta sustancia existe contaminación en toda la masa de agua, tanto en zonas rocosas como en zonas en contacto con sedimento.

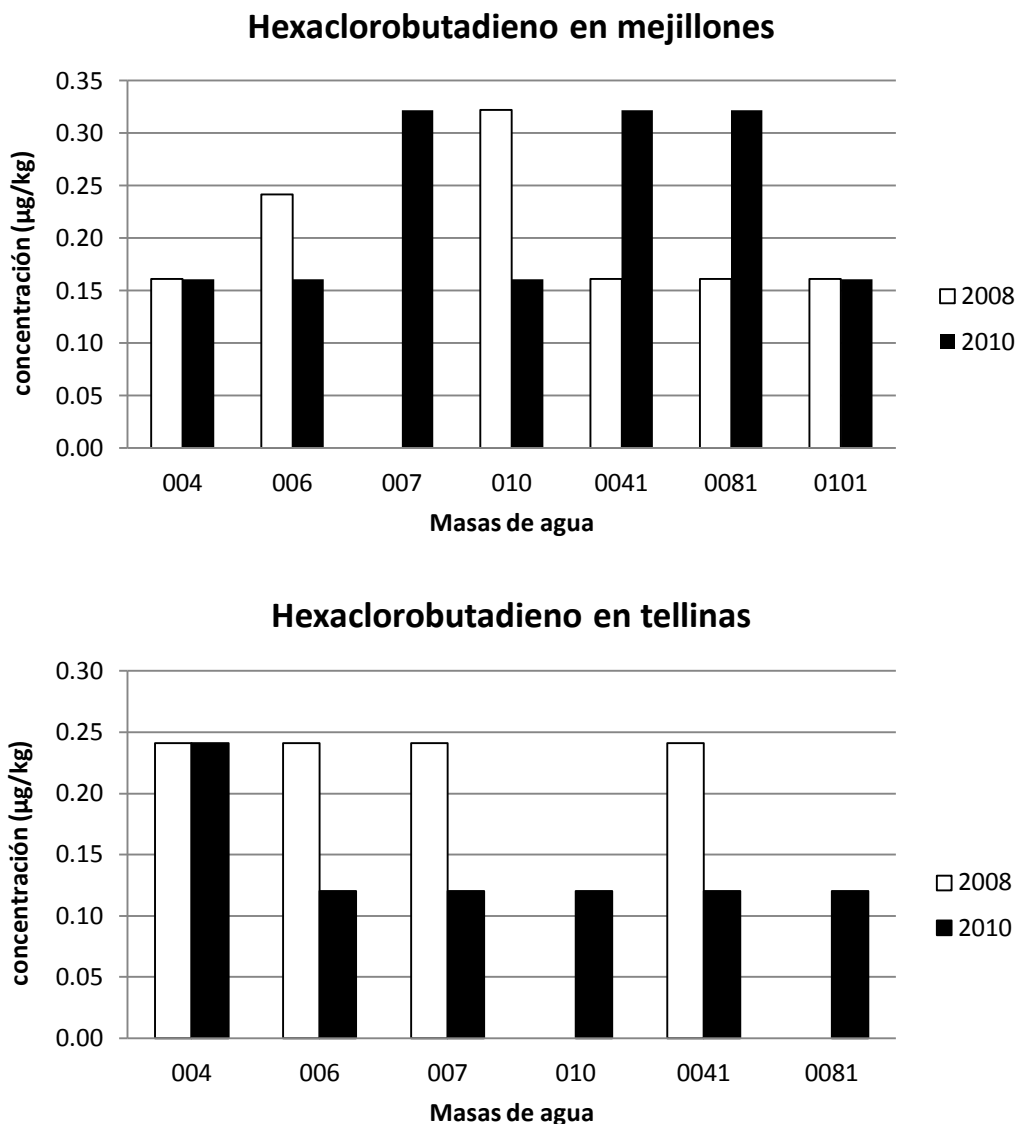


Figura 104. Concentraciones de hexaclorobutadieno en mejillones y tellinas (2008-2010)

Como se puede observar en la Figura 104 el hexaclorobutadieno fue detectado en todas las masas salvo para el muestreo de vigilancia (2008), en la masa 007 para mejillón y en las zonas 010 y 0081 para tellina. Destaca la masa 010 por su elevada concentración en el muestreo de vigilancia (2008) para mejillón y la ausencia de este contaminante en tellina, algo similar a lo que sucede en la masa 0081.

En cualquier caso, las concentraciones detectadas en estos organismos son de varios ordenes de magnitud inferior a la NCA recomendada en bivalvos (55 µg/Kg).

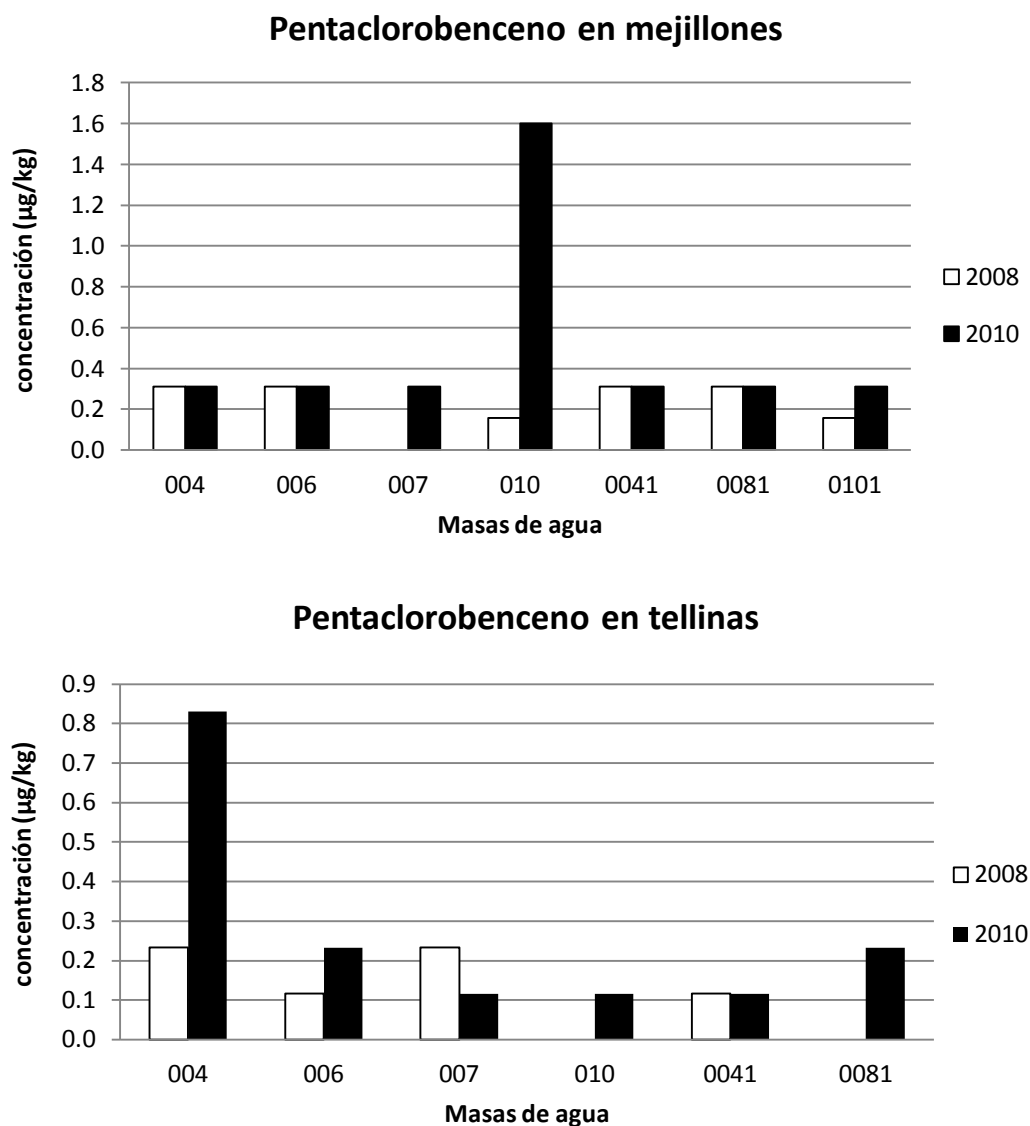


Figura 105. Concentraciones de pentaclorobenceno en mejillones y tellinas (2008-2010)

Siguiendo con la tendencia observada en los compuestos organoclorados, para el pentaclorobenceno se puede observar su presencia en todas las zonas (Figura 105), siendo similares las concentraciones detectadas en mejillón y tellina. Destacan las zonas 004 y 010, en las que se muestra un considerable aumento en la concentración detectada en tellina y mejillón, respectivamente.

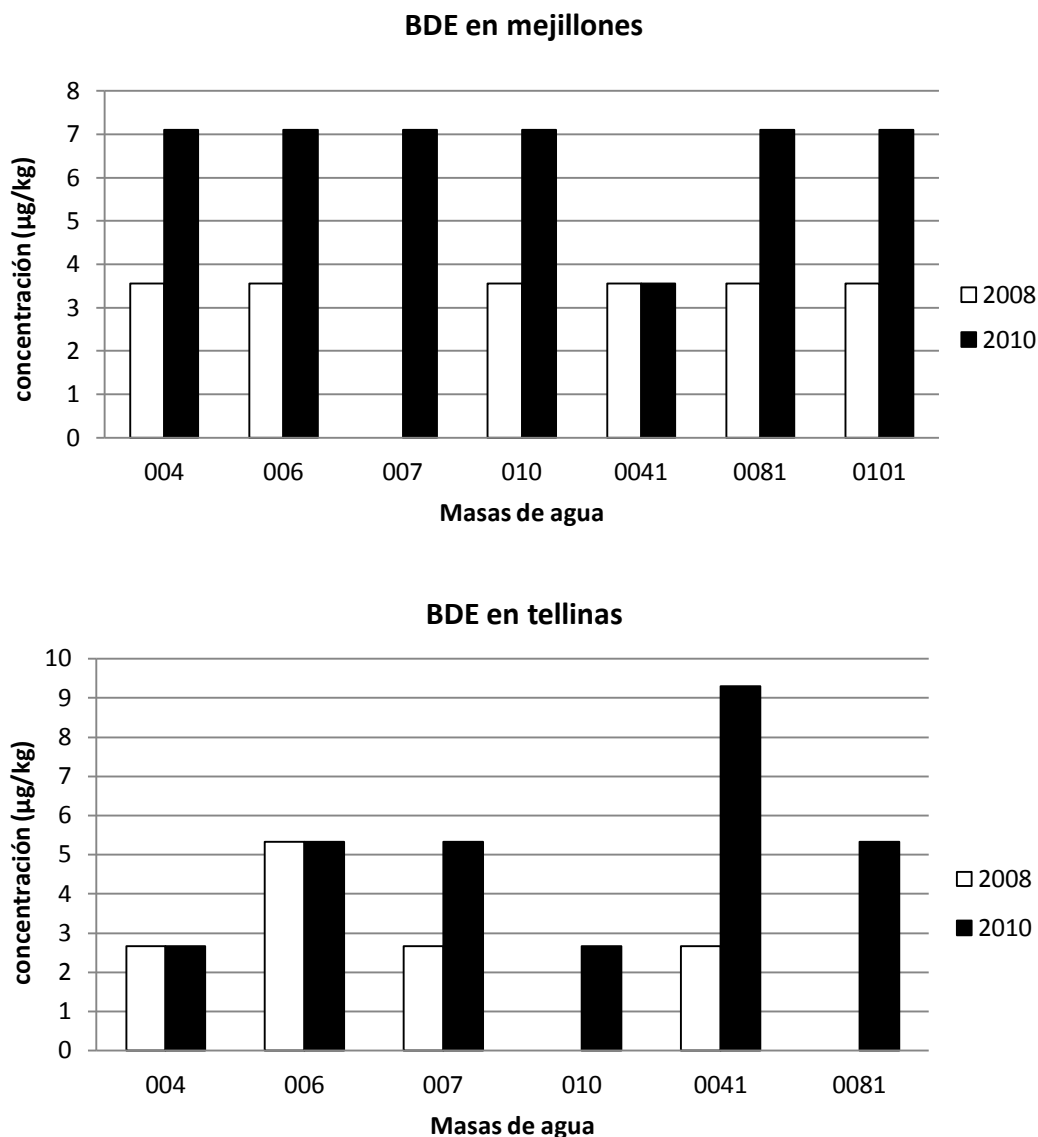


Figura 106. Concentraciones de BDE en mejillones y tellinas (2008-2010)

Al igual que se ha observado para otros compuestos halogenados, la presencia de BDE está generalizada en las masas estudiadas. Las concentraciones detectadas en el control operativo (2010) son superiores a las detectadas en el control de vigilancia (2008). En muestras de mejillón las concentraciones detectadas son ligeramente superiores a las detectadas en tellina, pero destaca la masa 0041, que presenta la menor concentración en mejillón y la más elevada en tellina.

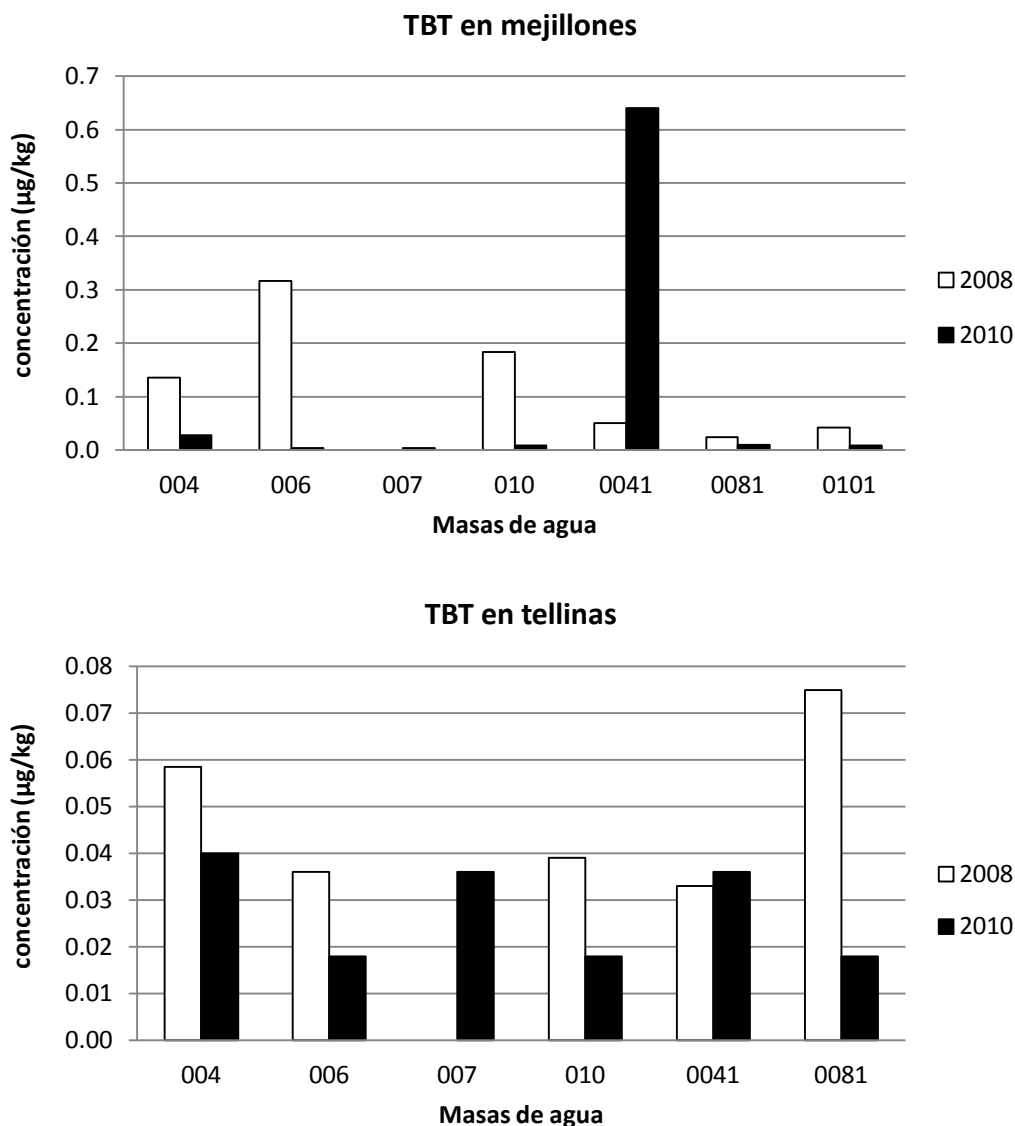


Figura 107. Concentraciones de TBT en mejillones y tellinas (2008-2010)

Como se observa en la figura anterior, el TBT fue detectado en la mayor parte de las masas en tellina y mejillón para el control de vigilancia (2008). En el control operativo (2010) su presencia fue generalizada en tellina, no tanto en mejillón, donde su presencia se reduce a la zona 0041, que destaca con una concentración detectada de 0.64 µg/kg. Se trata de una masa muy modificada por la proximidad a una zona portuaria, lo que podría justificar la elevada concentración de este contaminante utilizado en pinturas de embarcaciones.

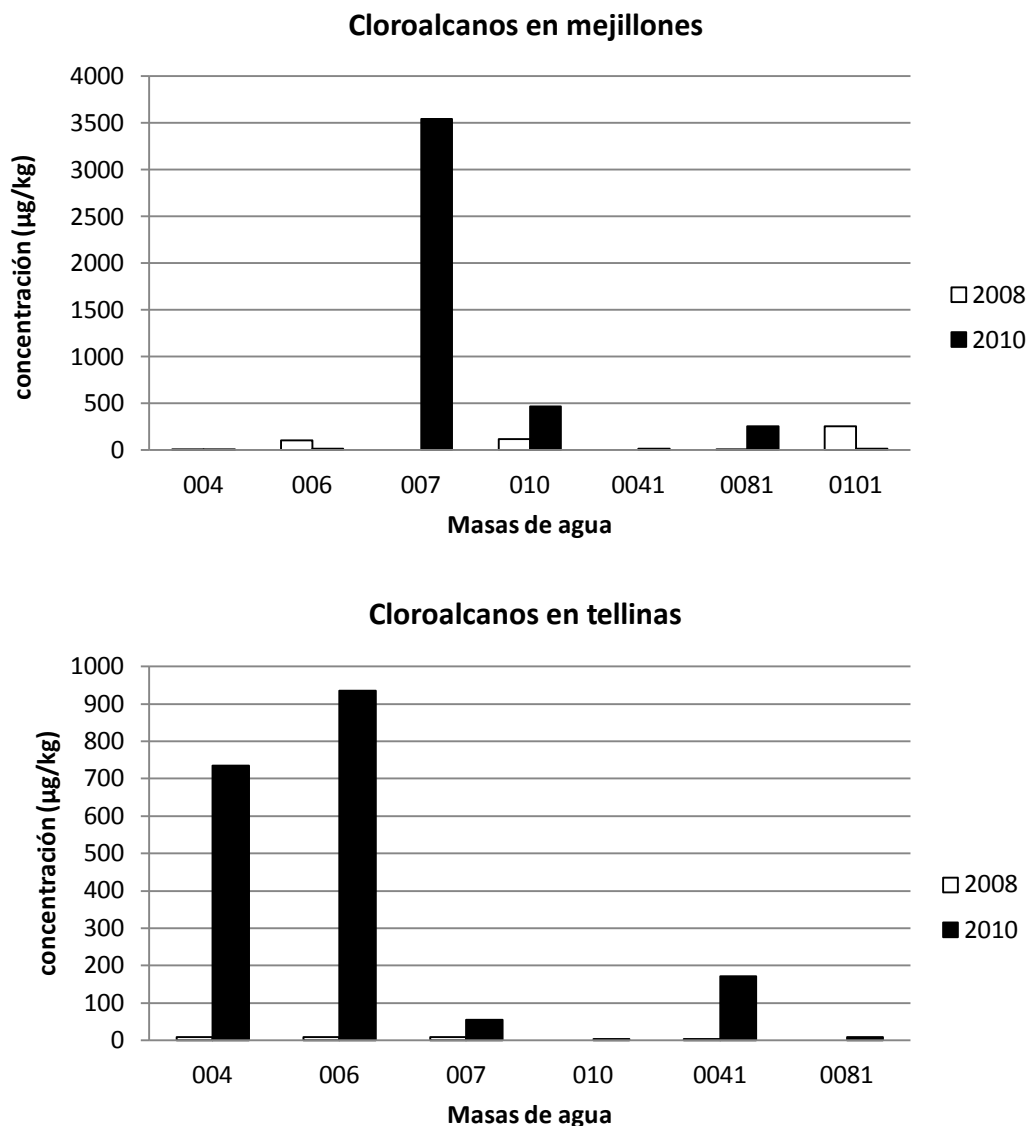


Figura 108. Concentraciones de cloroalcanos en mejillones y tellinas (2008-2010)

En la Figura 108 se observa como los cloroalcanos se detectaron a bajas concentraciones en el control de vigilancia (2008), siendo mayores éstas en el control operativo (2010). Cabe resaltar, la elevada concentración detectada en la zona 007 para mejillón (3545 µg/kg), y las zonas 004 y 006, donde las concentraciones detectadas en tellinas fueron 735 µg/kg y 936 µg/kg, respectivamente. En general, las masas más afectadas corresponden a zonas con una elevada carga industrial o a zonas próximas a éstas.

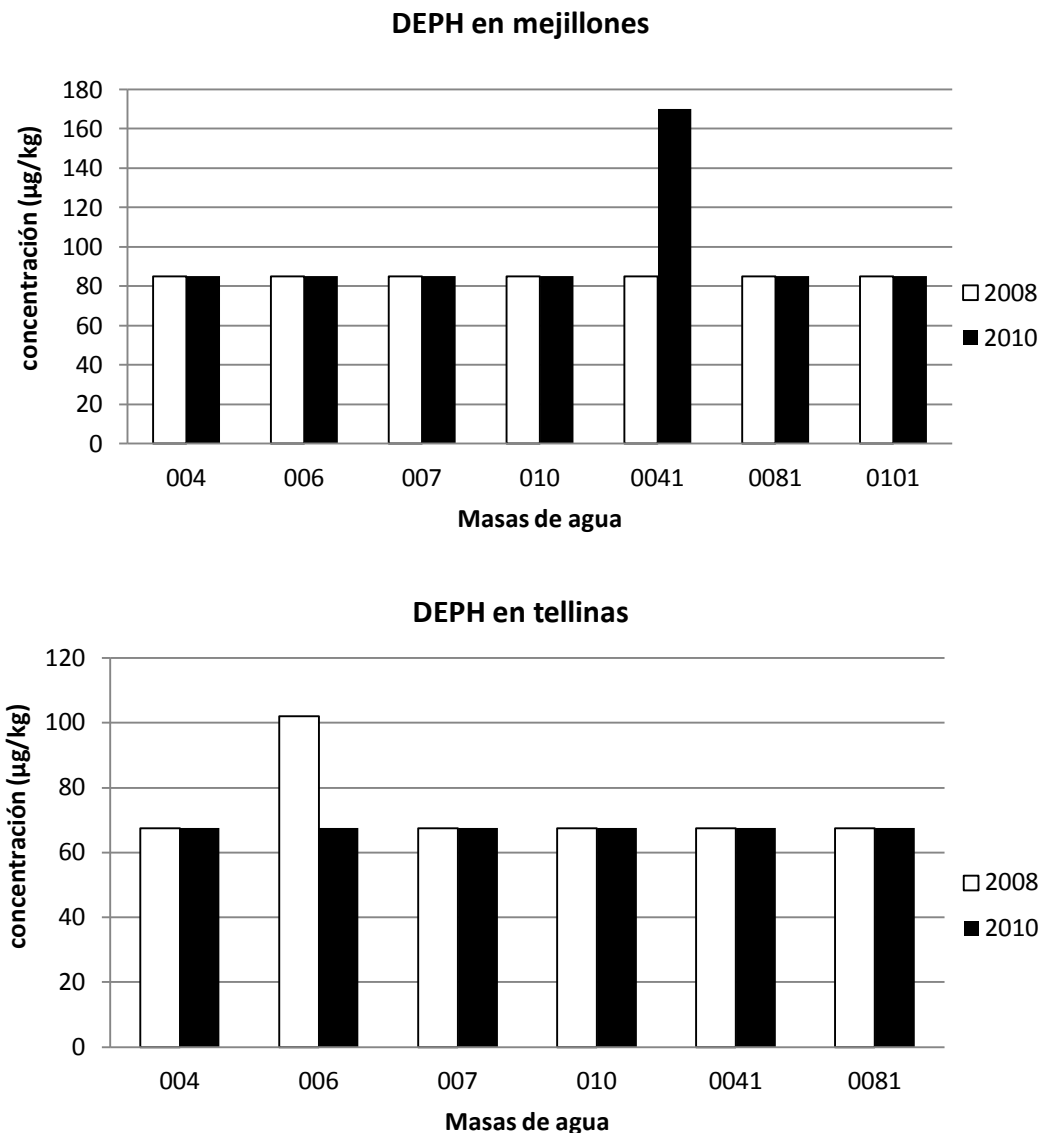


Figura 109. Concentraciones de dietilhexilftalato (DEPH) en mejillones y tellinas (2008-2010)

En la figura anterior se puede observar, que el DEPH es un contaminante frecuente en todas las zonas analizadas, además las concentraciones detectadas en ambos muestreos son similares salvo para la zona 0041, donde se observa una mayor concentración en el control operativo (2010) para mejillón, y la zona 006, donde se observar una mayor concentración en el control de vigilancia (2008) para tellina.

5.3 MUESTRAS DE SEDIMENTO

5.3.1 CONTROL DE VIGILANCIA (2010-2011-2012)

Los muestreos realizados en sedimentos durante 2010, 2011 y 2012 se engloban dentro del control de vigilancia aplicable a esta matriz. Este control de vigilancia permite establecer valores de referencia para la posterior evaluación de la tendencia a la acumulación a largo plazo en el sedimento.

Como ya se ha explicado en el capítulo 3, debido a la capacidad de acumulación de determinadas sustancias en biota y sedimentos, los compuestos analizados en esta matriz han sido los mismos que en la matriz biota, es decir: fenoles (t-nonilfenol, 4-nonilfenol, octilfenol); hidrocarburos aromáticos policíclicos o HAP (antraceno, benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, fluoranteno); pesticidas organoclorados (HCB, HCBd, HCH y PeCB); cloroalcanos; tributilo de estaño; y difenil-éteres-bromados.

Los siguientes gráficos muestran los resultados obtenidos en el control de vigilancia realizado al sedimento del litoral de la Comunidad Valenciana.

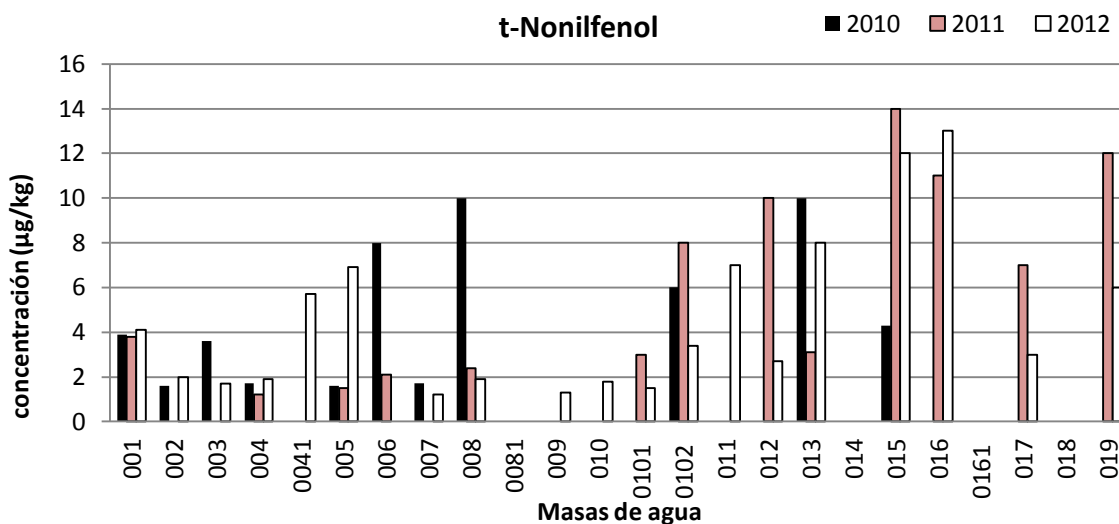


Figura 110. Concentraciones de t-nonilfenol en sedimentos (2010-2011-2012)

Como muestra la Figura 110, se detecta la presencia de t-nonilfenol en la mayor parte de las masas analizadas, salvo en las zonas 0081, 014, 0161 y 018, alcanzando concentraciones de hasta 14 µg/kg. Las concentraciones detectadas en sedimento son varios órdenes de magnitud inferior a las detectadas en organismos bivalvos.

El 4-nonilfenol, únicamente se detectó en 4 masas durante la campaña de 2010, no alcanzando concentraciones superiores a los 0.8 µg/kg. Al igual, que ocurre para t-nonilfenol las concentraciones detectadas en sedimento son inferiores a las concentraciones detectadas en bivalvos.

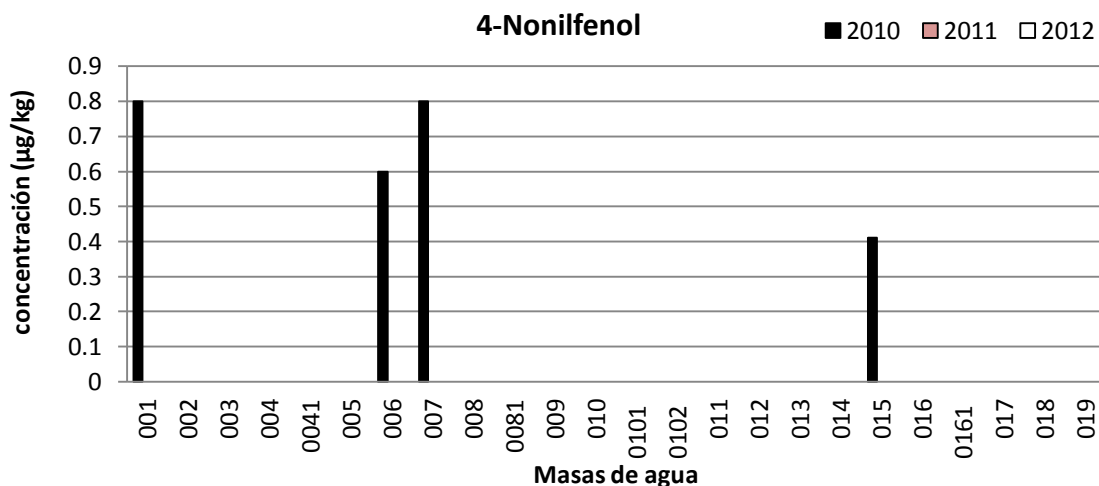


Figura 111. Concentraciones de 4-nonilfenol en sedimentos (2010-2011-2012)

Tal y como muestra la Figura 112, el octilfenol se detectó en pocas masas, alcanzando las concentraciones más elevadas en la campaña de 2012. En general, de los compuestos de tipo fenólico, no se observa una tendencia clara generalizada a la acumulación en las masas estudiadas. Siendo el t-nonilfenol el compuesto más detectado en la masas y a las mayores concentraciones. El octilfenol también presenta mayor concentración en muestras de bivalvos que en sedimento, lo que muestra que este tipo de compuestos fenólicos tienden a la bioacumulación.

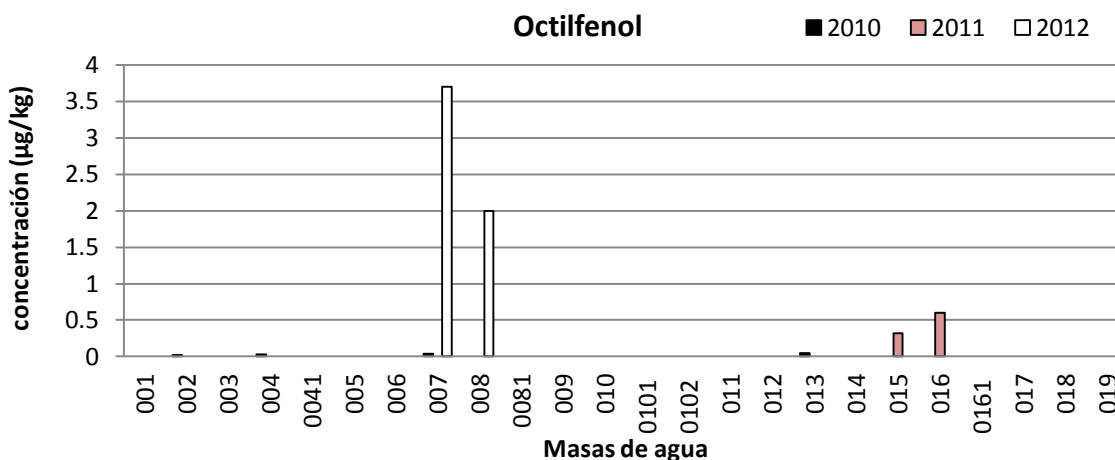


Figura 112. Concentraciones de octilfenol en sedimentos (2010-2011-2012)

La Figura 113 muestra las concentraciones de antraceno en sedimento, su presencia durante el muestreo de 2010 fue generalizada, no siendo detectado durante 2011, salvo en la zona 001. Sin embargo, es destacable la presencia de este contaminante en la masa 010 durante la campaña de 2012, donde fue detectado sólo en dos masas (006 y 010), alcanzando concentraciones de 40 µg/kg.

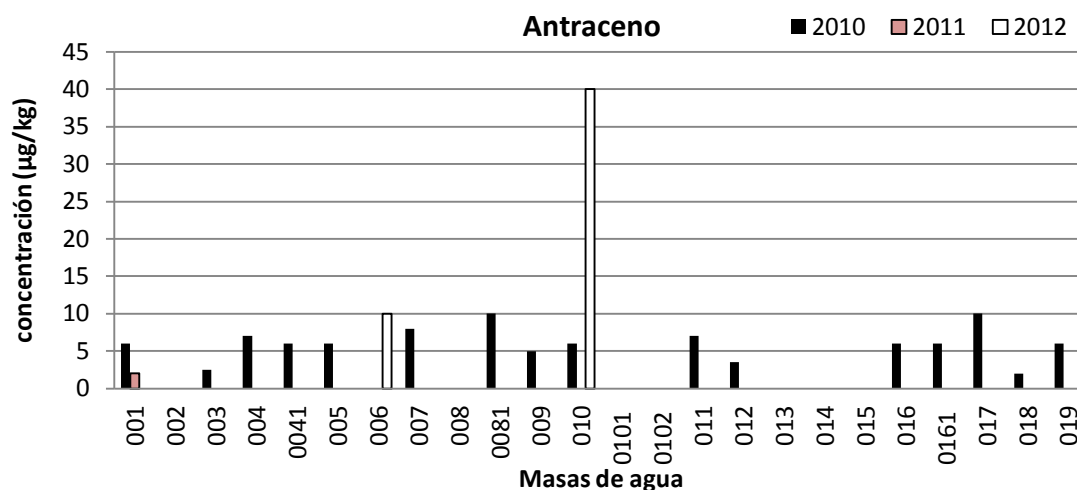


Figura 113. Concentraciones de antraceno en sedimentos (2010-2011-2012)

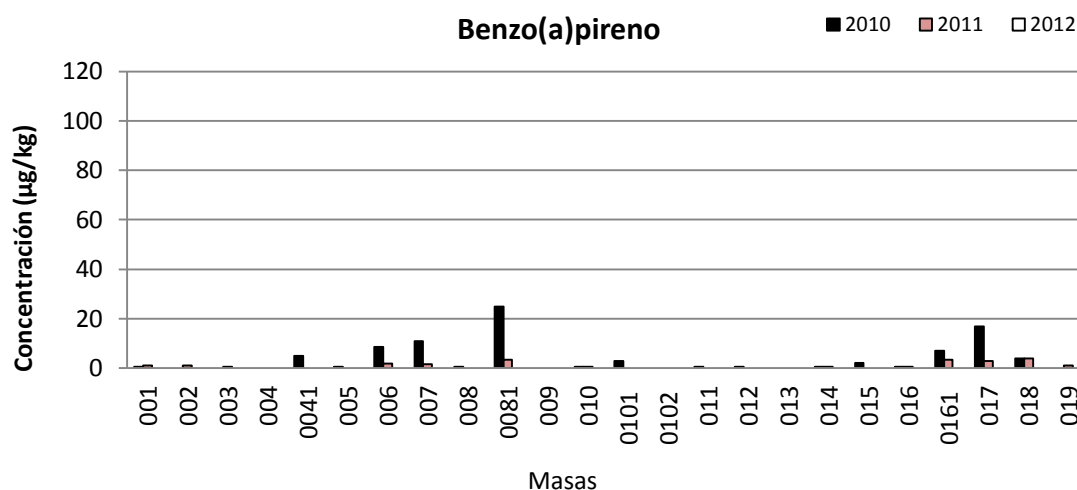


Figura 114. Concentraciones de benzo(a)pireno en sedimentos (2010-2011-2012)

Algo similar sucede para benzo(a)pireno, como se observa en la Figura 114, durante las campañas 2010 y 2011 la presencia de este contaminante está generalizada. Sin embargo, su concentración en 2012 se ve incrementada considerablemente en las zonas 006 y 010, llegando a alcanzar 115 µg/kg. Aunque no existe una NCA para estos compuestos las concentraciones detectadas están por encima de las concentraciones máximas recomendadas.

Como indica la Figura 115, el benzo(b)fluoranteno muestra una tendencia generalizada durante 2010 y 2011, salvo para la zona 018 en la que la concentración detectada es superior al resto de zonas para esa campaña. Este dato se asocia a un valor puntual y sólo observado para este contaminante. No obstante, vuelve a llamar la atención la elevada presencia de este contaminante en las zonas 006 y 010 durante la campaña de 2012.

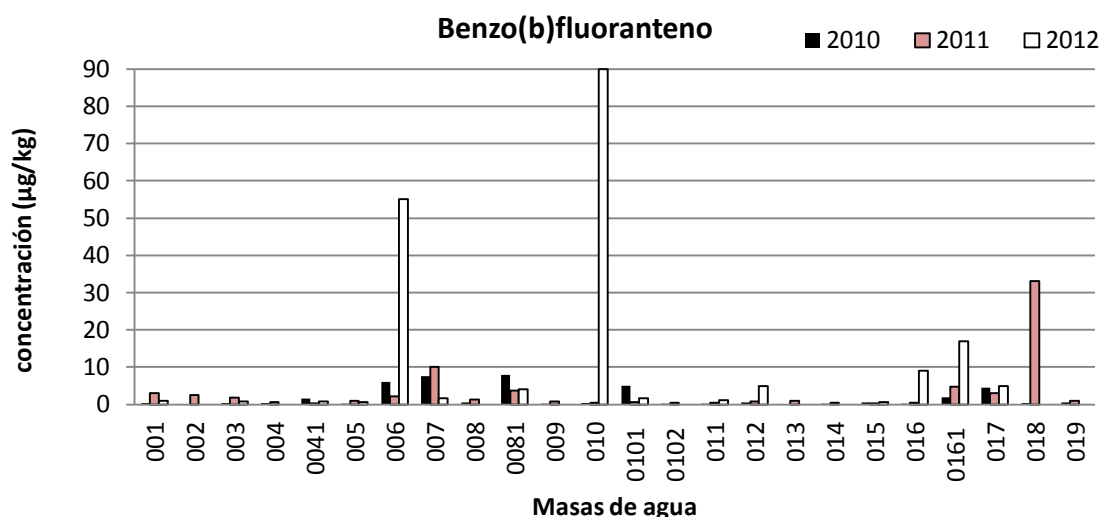


Figura 115. Concentraciones de benzo(b)fluoranteno en sedimentos (2010-2011-2012)

Para benzo(k)fluoranteno (Figura 116) se mantiene la tendencia seguida por otros HAP en las zonas 006 y 010 durante la campaña de 2012. El resto de zonas muestra la presencia de este compuesto a menores concentraciones durante los tres muestreos.

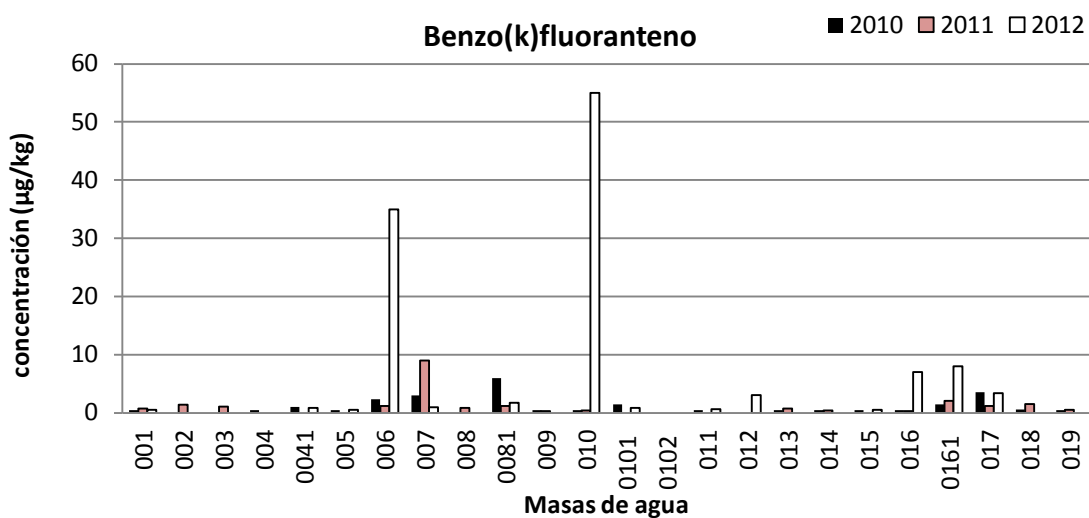


Figura 116. Concentraciones de benzo(k)fluoranteno en sedimentos (2010-2011-2012)

La presencia de fluoranteno (Figura 117) se observa en diferentes zonas durante la campaña de 2012, además de las zonas afectadas por otros HAP, se detectó en las zonas 011 y 013 a similares concentraciones que las detectadas en la zona 006. De nuevo, se detectó la mayor concentración en la zona 010.

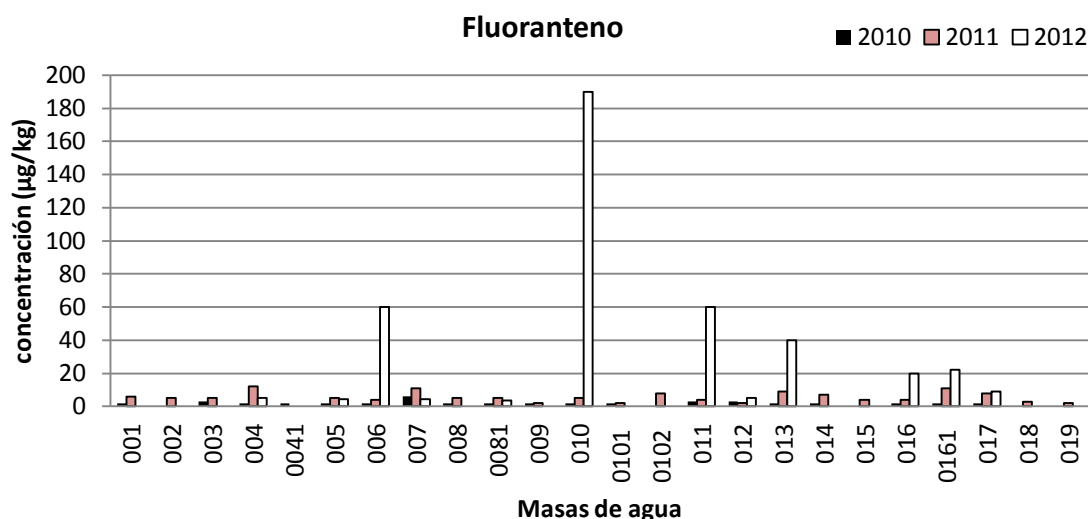


Figura 117. Concentraciones de fluoranteno en sedimentos (2010-2011-2012)

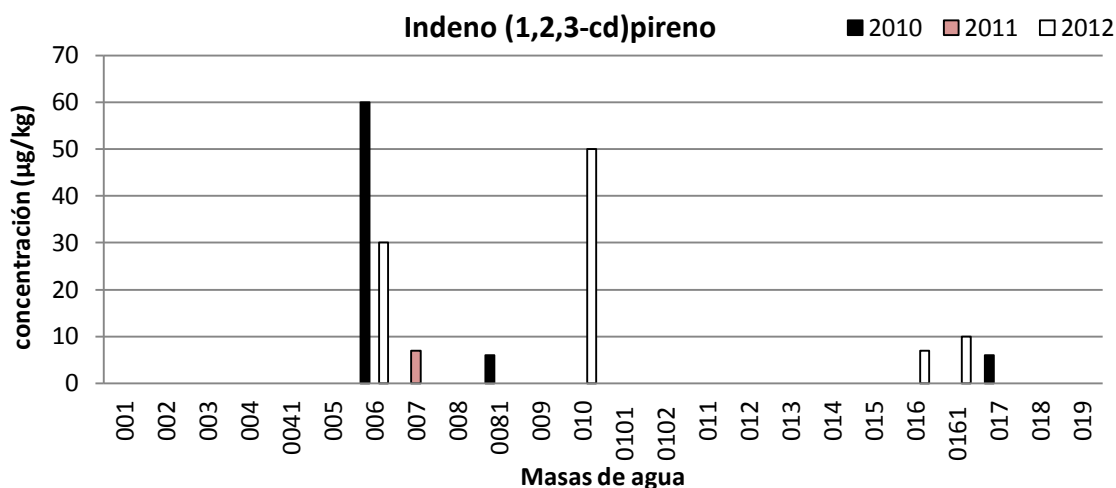


Figura 118. Concentraciones de indeno(1,2,3-cd)pireno en sedimentos (2010-2011-2012)

La Figura 118 muestra la concentraciones de indeno(1,2,3-cd)pireno en muestras de sedimento, donde se observa la presencia de este contaminante en zonas puntuales. En la campaña de 2010 se detectó a elevada concentración en la zona 006, esta zona vuelve a mostrar elevadas concentraciones en la campaña de 2012 junto con la zona 010. Durante 2011 sólo se

observó la presencia de este contaminante en la zona 007 a concentraciones inferiores a 10 µg/kg.

En sedimentos de la Comunidad Valenciana se observa una tendencia general con respecto al análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, elevadas concentraciones de estas sustancias en la campaña de 2012, especialmente en las masas 006 y 010. Concretamente, la suma de los HAP analizados alcanzó una concentración de 300 µg/kg en la masa 006 y de 600 µg/kg en la masa 010. La misma tendencia se ha observado para todos los HAP, lo que indica que en estas zonas ha habido una emisión de estos contaminantes en 2012, no observándose en las campañas de 2010 y 2011.

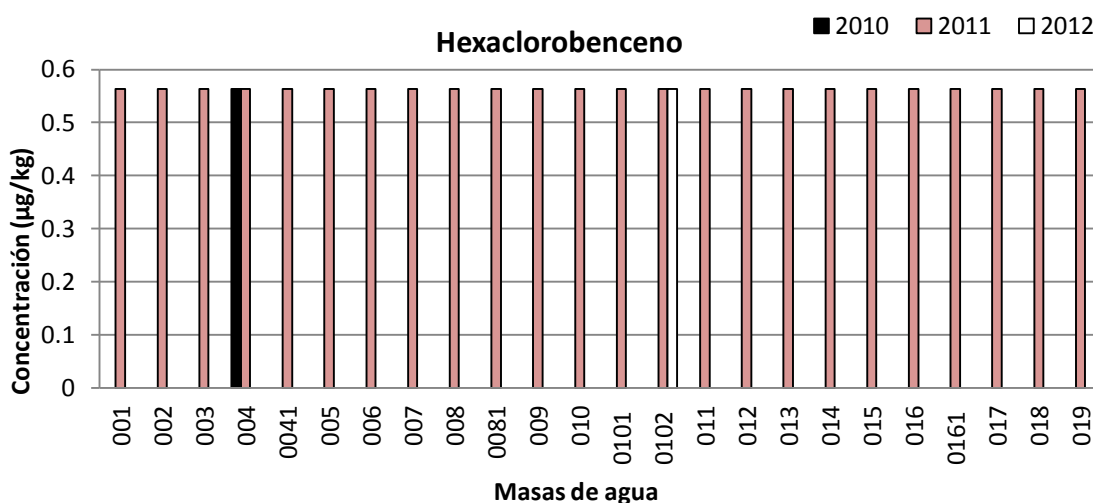


Figura 119. Concentraciones hexaclorobenceno en sedimentos (2010-2011-2012)

En la Figura 119 se observa que solo dos masas presentaron contaminación por hexaclorobenceno, la zona 004 en el muestreo de 2010 y la zona 0102 en el muestreo de 2011. En 2012 ninguna masa se vió afectada por la presencia de este contaminante. No se observa una tendencia para este contaminante ya que las masas no están próximas entre sí, ni corresponden al mismo muestreo. En ambos casos las concentraciones detectadas eran muy inferiores a las concentraciones recomendadas para sedimento.

En la figura siguiente se muestran los resultados obtenidos con hexaclorociclohexano, en este caso se ve una tendencia generalizada, en los muestreos de 2010 y 2011, destacando las zonas 005 y 019 en las que las concentraciones fueron superiores. En 2012 se detectó hexaclorociclohexano en dos zonas (007 y 019) a concentraciones del orden del resto de zonas.

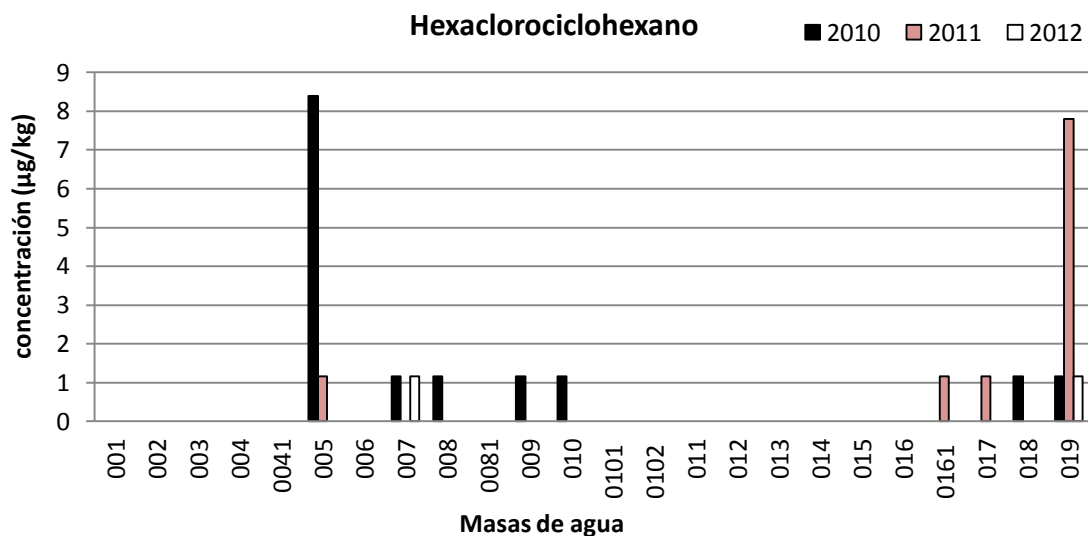


Figura 120. Concentraciones de hexaclorociclohexano en sedimentos (2010-2011-2012)

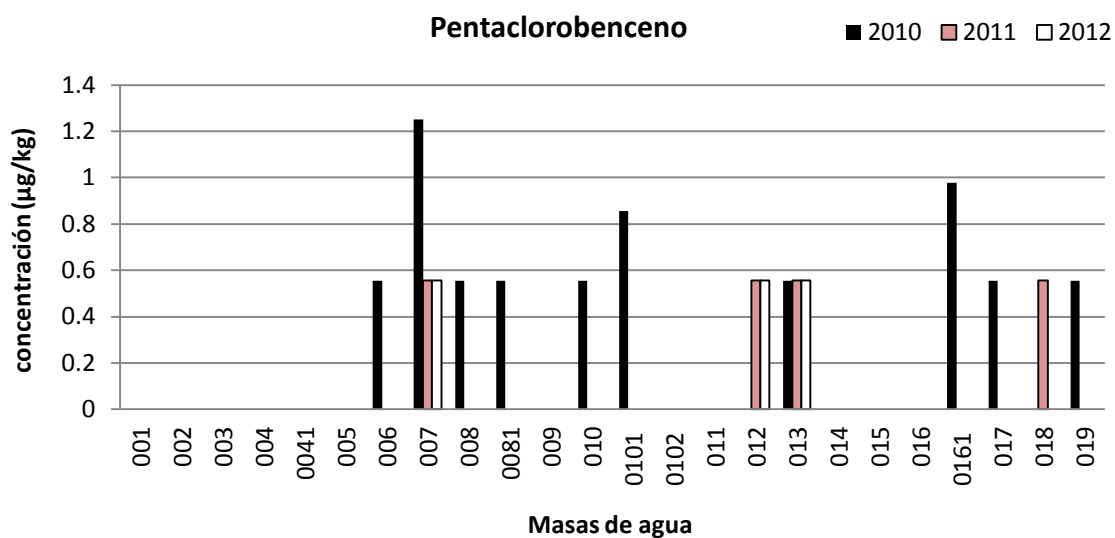


Figura 121. Concentraciones de pentaclorobenceno en sedimentos (2010-2011-2012)

Como se observa en la Figura 121, la presencia de pentaclorobenceno en sedimento estaba más extendida durante el muestreo de 2010, disminuyendo considerablemente en las masas afectadas así como su concentración en los muestreos de 2011 y 2012. Entre las zonas más afectadas se encuentran zonas próximas a áreas industrializadas y masas muy modificadas por la presencias de zonas portuarias.

La presencia de hexaclorobutadieno presenta una tendencia generalizada, especialmente en 2010, siendo detectado a bajas concentraciones salvo para la zona 005 donde se cuantificó

una concentración de 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esta concentración está muy por encima de las concentraciones detectadas para esta familia de compuestos, aunque es menor que la NCA recomendada para hexaclorobutadieno en sedimento o biota (55 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

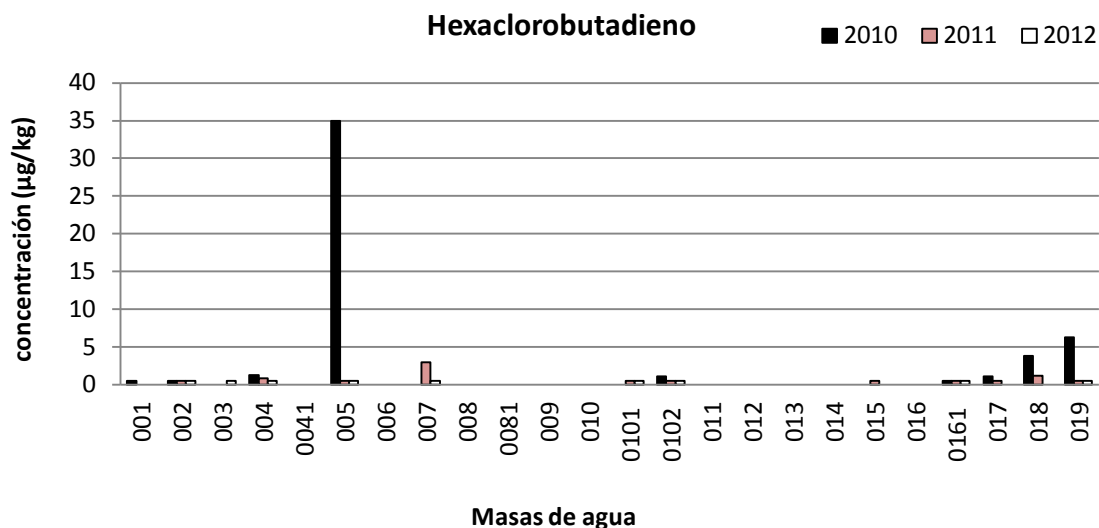


Figura 122. Concentraciones de hexaclorobutadieno en sedimentos (2010-2011-2012)

En general, entre los compuestos organoclorados analizados, se observa una mayor concentración de éstos en los sedimentos recogidos en la campaña de 2010, mostrando una clara disminución en las dos campañas posteriores.

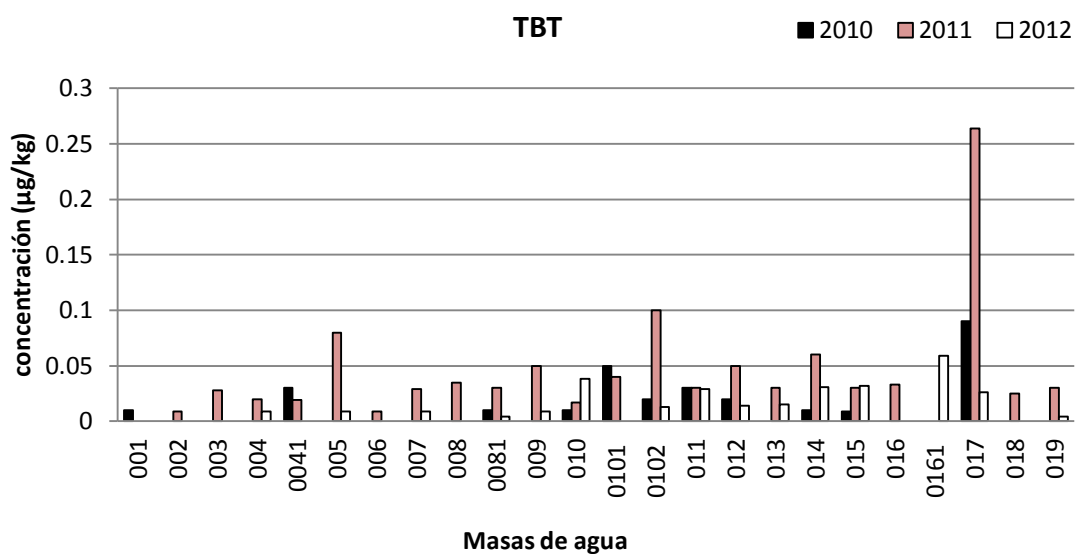


Figura 123. Concentraciones de TBT en sedimentos (2010-2011-2012)

La presencia de tributilo de estaño (Figura 123) en sedimentos se muestra de manera generalizada en todas las masas estudiadas. Las concentraciones en la campaña de 2011 presentan los valores más elevados durante el período de análisis, destaca la masa 017 que alcanza concentraciones superiores a 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

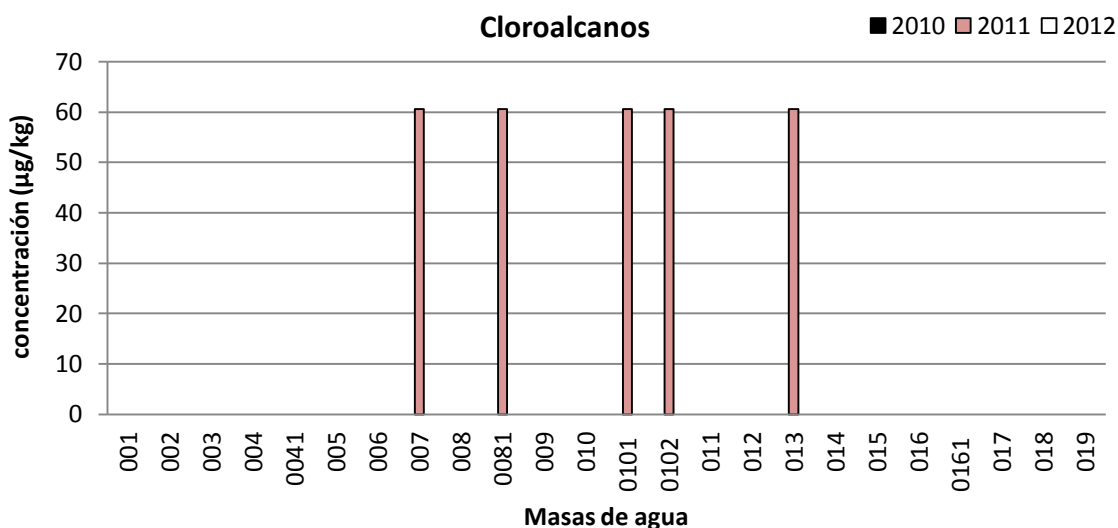


Figura 124. Concentraciones de cloroalcanos en sedimentos (2010-2011-2012)

La Figura 124 indica que únicamente se detectaron cloroalcanos durante el muestreo realizado en 2011, en concentraciones del orden del límite de detección. Entre las masas afectadas se encuentran tres masas de agua muy mofiiicadas por la presencia de zonas portuarias (0081, 0101 y 0103).

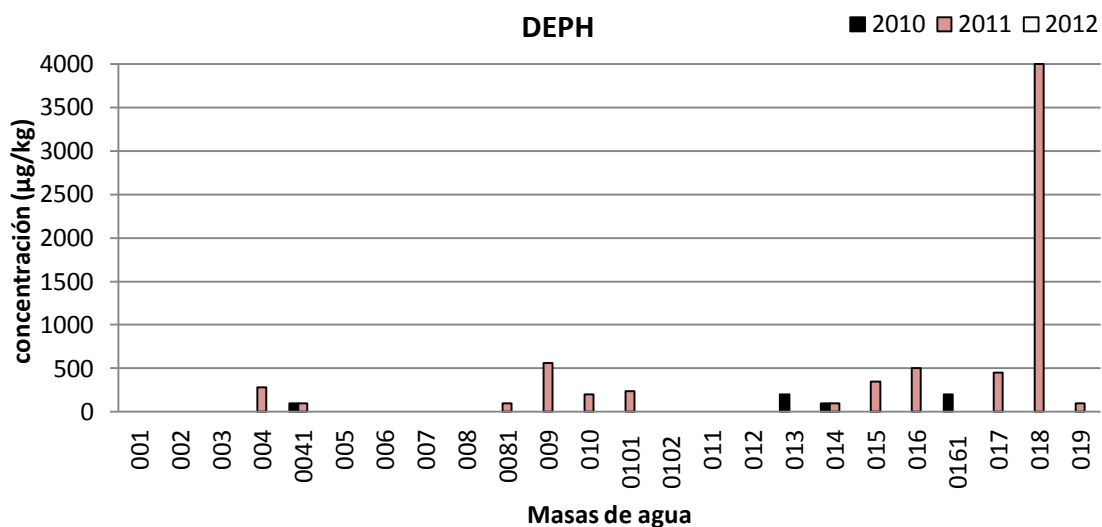


Figura 125. Concentraciones de DEPH en sedimentos (2010-2011-2012)

Finalmente, como se observa en la Figura 125 la presencia de dietilhexilftalato fue más significativa en el muestreo realizado en 2011, destacando la masa 017, en la que se alcanzó una concentración de 4000 µg/kg. Cabe resaltar que en 2012 no se detectó este compuesto en ninguna de las masas analizadas.

5.3.2 SUSTANCIAS PRIORITARIAS EN AGUAS COSTERAS Y SEDIMENTOS

Para aquellas sustancias prioritarias que superaron NCA-MA en el control de vigilancia en aguas costeras y con potencial para quedar retenidas en el sedimento, se ha realizado un seguimiento de la evolución de la concentración en agua costeras y en sedimento para los muestreos realizados durante el control operativo (2010, 2011 y 2012). Las sustancias y las masas sobre las que se ha realizado este seguimiento se detallan a continuación:

- Octilfenol: superó la NCA-MA en la masa 006.
- Pentaclorobenceno: superó la NCA-MA en las masas 001, 003, 004, 0041 y 008.
- Dietilhexilftalato: superó la NCA-MA en las masas 001, 004, 0041, 006, 008, 0081, 010, 0102, 014, 016.
- Tributilo de estaño (TBT): superó la NCA-MA en la masa 0102.

A continuación se presentan una serie de figuras que incluyen para cada masa de agua y sustancias de interés las concentraciones medias en aguas costeras (expresadas en µg/L) y la concentración obtenida en el sedimento (expresada en µg/kg) para los años 2010, 2011 y 2012. Las casillas que aparecen sin valor, indican que el compuesto no fue detectado.

5.3.2.1 Octilfenol

Aunque el octilfenol superó la NCA-MA en el control de vigilancia en la masa 006, no se detectó posteriormente durante el control operativo. De la misma forma, con los límites de detección establecidos, no se observó presencia de este compuesto en el sedimento.

5.3.2.2 Pentaclorobenceno

El pentaclorobenceno superó la NCA-MA en las masas 001, 003, 004, 0041 y 008. Sin embargo, en las muestras de sedimentos no se observó la presencia de este compuesto en ninguna de ellas, a excepción de en la masa 008.

Tal y como muestra la Figura 126, sólo en el muestreo de 2010 se detectó pentaclorobenceno en los sedimentos de esta masa de agua. Es destacable que en las aguas costeras, durante el control operativo, sólo se observó este compuesto en concentraciones poco

significativas del orden del LD durante el muestreo de 2010. No obstante, en sedimento se alcanzaron concentraciones de 0.555 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

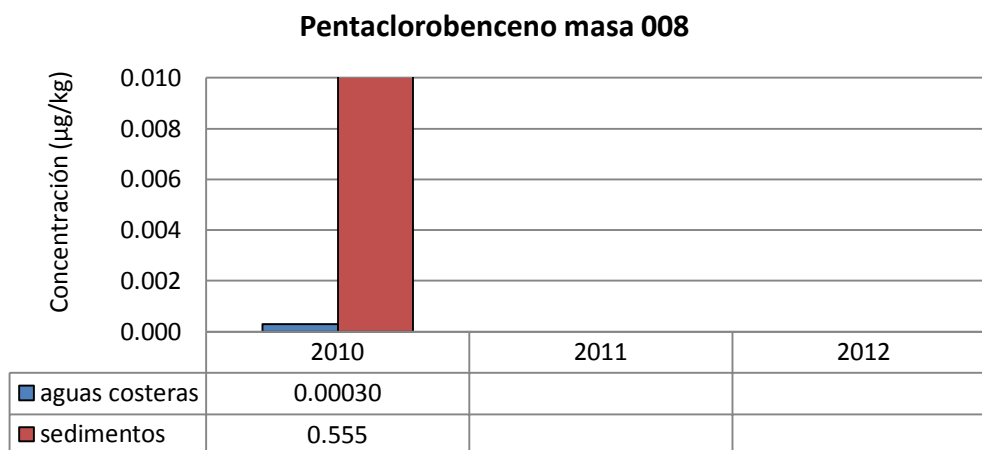


Figura 126. Concentraciones de pentaclorobenceno en aguas y sedimentos de la masa 008 (2010, 2011, 2012).

5.3.2.3 Dietilhexilftalato (DEPH)

Como se puede observar en las siguientes figuras se detectó dietilhexilftalato en aguas costeras durante las tres campañas de estudio, presentando mayores concentraciones durante 2010 que disminuyeron en las siguientes campañas. Sin embargo, en sedimento sólo se detectó en 2010 y 2011, especialmente en este último año.

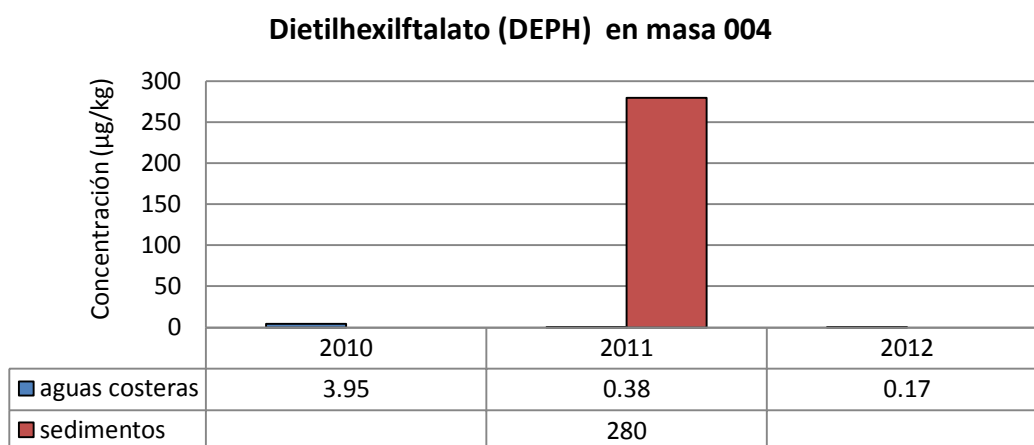


Figura 127. Concentraciones de DEPH en aguas y sedimentos de la masa 004 (2010, 2011, 2012).

La Figura 127 representa los datos obtenidos para la masa 004, en la cual se detectó DEPH en agua durante las tres campañas de muestreo, cuya concentración disminuyó

gradualmente, pero únicamente se detectó en sedimento en 2011, alcanzando concentraciones de 280 µg/kg.

En la masa 0041, se ve una clara disminución en las concentraciones de este contaminante en muestra de agua. En cuanto al sedimento, fue detectado en 2010 y 2011 a la misma concentración pero no en 2012.

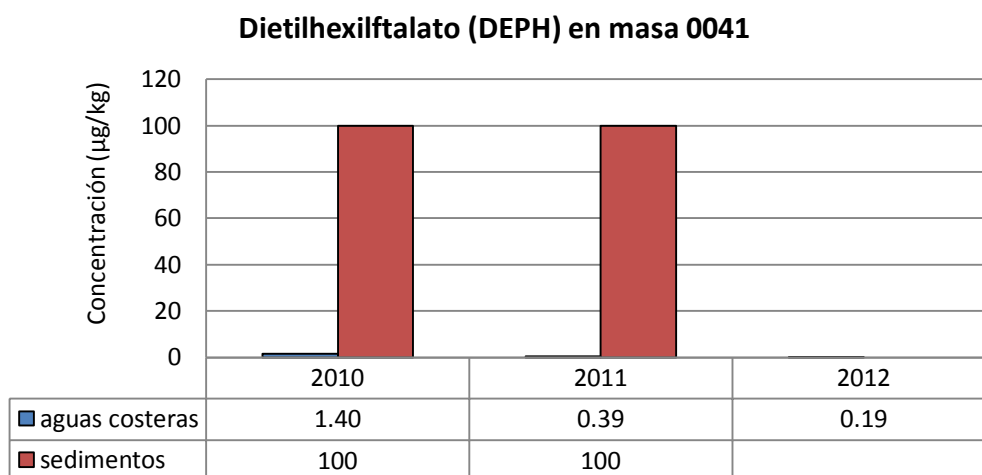


Figura 128. Concentraciones de DEPH en aguas y sedimentos de la masa 0041 (2010, 2011, 2012).

En la masa 0081, al igual que para la masa 004 y 0041, se observó un descenso gradual en las concentraciones detectadas en muestras de agua. De nuevo se puede ver que, aun siendo detectado en las tres campañas de agua, sólo fue detectado en sedimento en el muestreo de 2011.

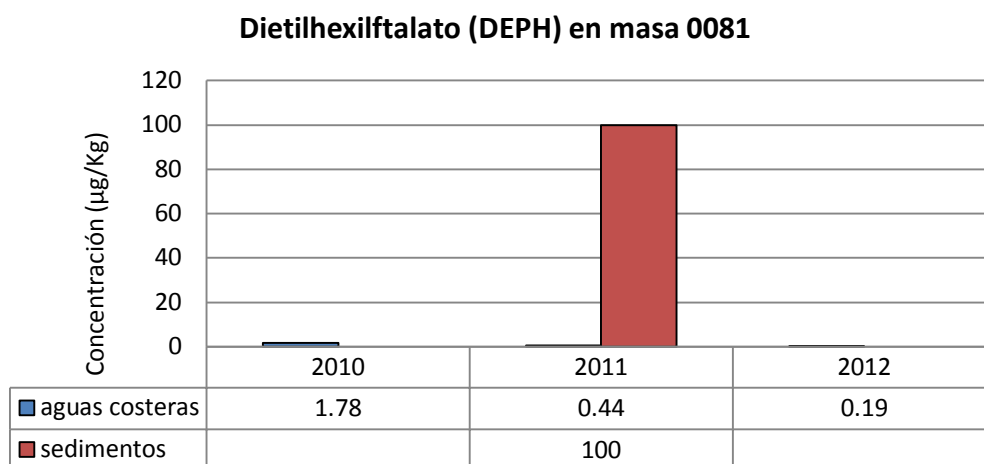


Figura 129. Concentraciones de DEPH en aguas y sedimentos de la masa 0081 (2010, 2011, 2012).

Resulta curioso observar, que la masa 0081, aun siendo una masa muy modificada por la presencias de un puerto, presenta una mayor similitud a la masa 004 que a la masa 0041, siendo esta última una masa próxima a puerto.

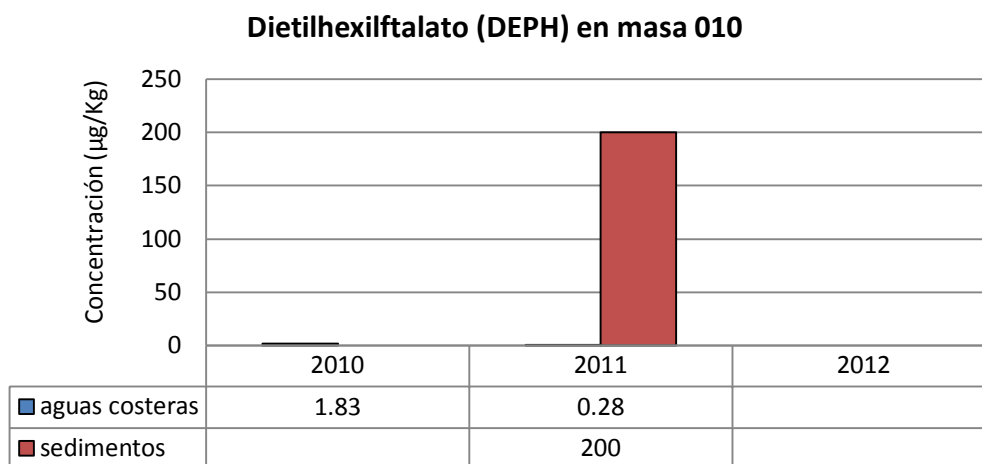


Figura 130. Concentraciones de DEPH en aguas y sedimentos de la masa 010 (2010, 2011, 2012).

En la masa 010, al igual que sucedía en la masa 0081 y 004 sólo se detectó DEPH en sedimento en 2011. De nuevo, se reconoce la tendencia seguida en muestras de agua costera, la concentración disminuye o no se detecta el 2012.

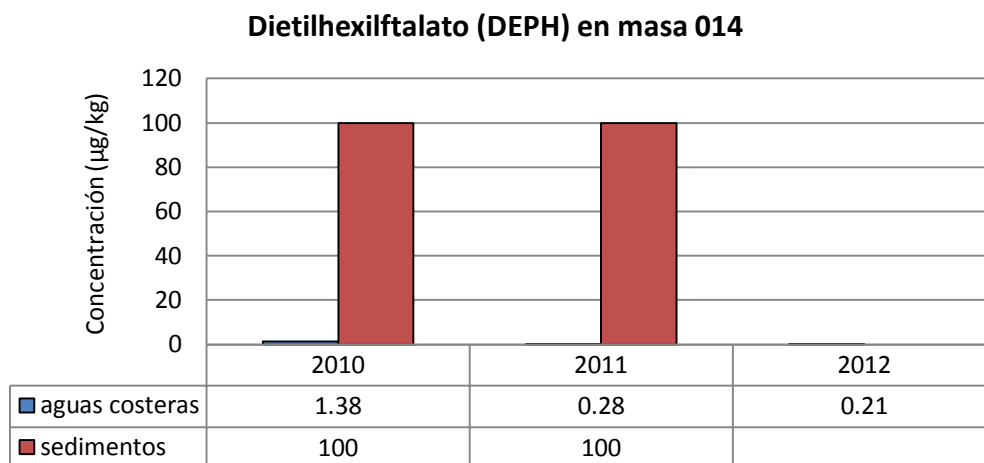


Figura 131. Concentraciones de DEPH en aguas y sedimentos de la masa 014 (2010, 2011, 2012).

Las concentraciones de este contaminante en las aguas costeras de la masa 014 decrecen en las diferentes campañas, mostrando un claro descenso entre 2010 y 2011, manteniéndose prácticamente constantes entre 2011 y 2012. En sedimento se detectó en 2010 y 2011 a la misma concentración.

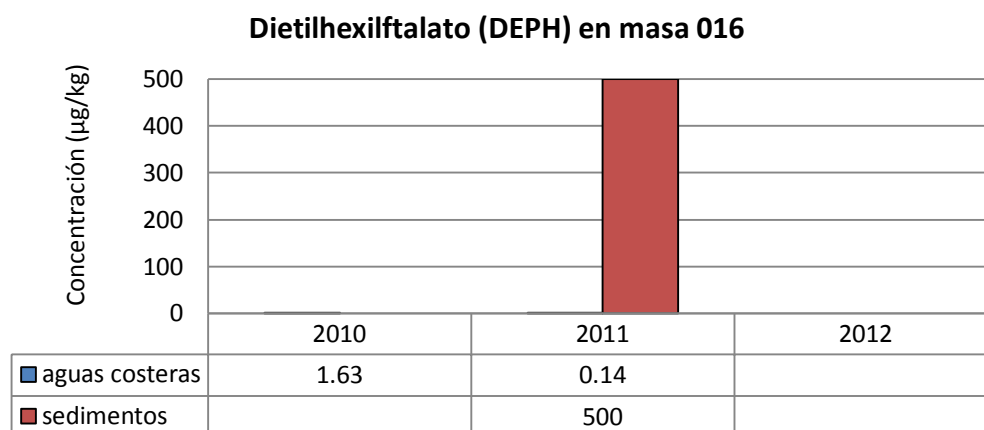


Figura 132. Concentraciones de DEPH en aguas y sedimentos de la masa 016 (2010, 2011, 2012).

En la masa 016 se sigue el patrón observado para el resto de masas. La concentración detectada en agua decrece, y 2011 es la única campaña en la que se detectaba DEPH. En este caso, llegando a alcanzar concentraciones de 500µg/kg.

5.3.2.4 Tributilo de estaño (TBT)

El tributilo de estaño, que superó continuamente la NCA-MA (0.0002 µg/L) en la masa 0102, presentó también concentraciones en el sedimento durante los tres años de muestreo.

En muestras de agua mostraba un claro descenso en las concentraciones detectadas entre 2010 y 2011, en las que prácticamente se mantenía, y 2012 es cuantificado a una menor concentración. En muestra de sedimento aumentó considerablemente la contaminación detectada en 2011, llegando a alcanzar concentraciones de 0.10 µg/kg.

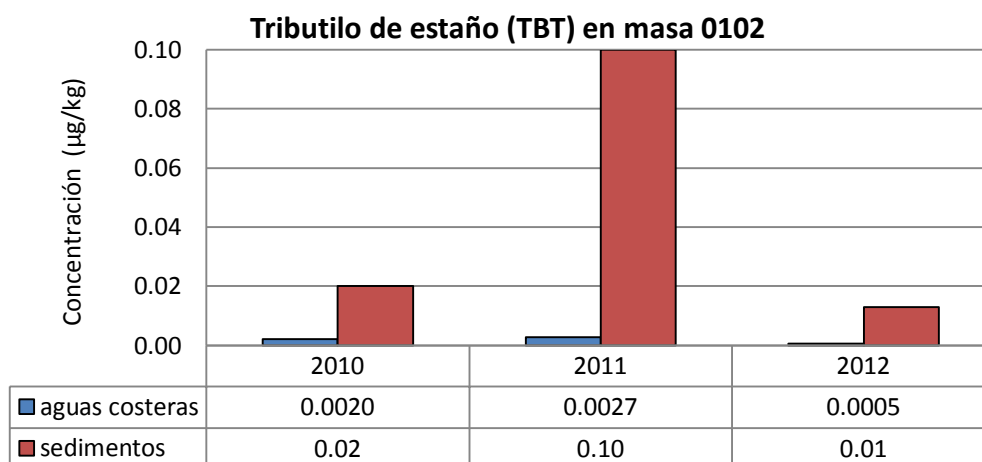


Figura 133. Concentraciones de TBT en aguas y sedimentos de la masa 0102 (2010, 2011, 2012).

CAPÍTULO 6.
CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis se ha dividido en dos partes claramente diferenciadas. Por un lado, se han desarrollado y optimizado métodos analíticos para la determinación de las sustancias prioritarias que establece la DMA. Dadas las diferencias entre las sustancias, éstas fueron clasificadas por familias: compuestos organoclorados, cloroalcanos (C10-13), compuestos organoestánicos, fenoles y alquilfenoles, hidrocarburos poliaromáticos, ftalatos, herbicidas tipo triazinas, ureas sustituidas e insecticidas organofosforados. Para algunas de estas familias (compuestos organoclorados, cloroalcanos (C10-13), compuestos organoestánicos, fenoles) se desarrollaron métodos que permitieran analizar las sustancias prioritarias en las diferentes matrices que estipula la DMA (agua, biota y sedimento). Para el resto de familias (alquilfenoles, hidrocarburos poliaromáticos, ftalatos, herbicidas tipo triazinas, ureas sustituidas e insecticidas organofosforados) se adaptaron o se aplicaron directamente métodos previamente desarrollados por el grupo de investigación o por otros autores.

Por otro lado, muestras de agua, biota y sedimento fueron analizadas, en diferentes campañas de muestreo llevadas a cabo entre 2008 y 2012, para determinar el estado químico de las aguas de la Comunidad Valenciana, según lo establecido en la DMA.

6.1 CONCLUSIONES SOBRE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS

- Los procedimientos analíticos desarrollados en este trabajo aportan nuevas metodologías basadas en el acoplamiento de diferentes técnicas de preconcentración, extracción, separación y detección. La metodología desarrollada permite el uso de métodos robustos y sensibles, con el menor coste y consumo de muestra.

- En general, los métodos analíticos propuestos en este trabajo cumplen los objetivos establecidos previamente. Con estos métodos es posible el análisis de contaminantes, en distintas matrices ambientales, a niveles de trazas. Los límites de detección conseguidos con los métodos desarrollados se adaptan a la normativa establecida para aguas y biota (DNCA 2008/105/CE), permitiendo valorar la calidad de las aguas de la Comunidad Valenciana.

6.1.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS ACUOSAS

- El método propuesto para la determinación de compuestos organohalogenados en muestras acuosas mediante SPME-GC- μ ECD permite la determinación de estos compuestos a las concentraciones fijadas por la legislación.

- La extracción de compuestos organoclorados de muestras acuosas mediante SPME-GC- μ ECD se ve favorecida en ausencia de NaCl y pH neutro. Entre las fibras estudiadas la que mejor recuperación ofrece es PDMS-DBV, trabajando a temperatura ambiente. El método optimizado permite determinar compuestos organoclorados con buenas recuperaciones y a menores límites

de detección que otras técnicas, permitiendo alcanzar las normas de calidad ambiental exigidas por la normativa vigente.

- En la determinación de compuestos organoestánicos, se puede concluir que, la SPME es una buena alternativa para la preconcentración de estos analitos en muestras acuosas, y que esta extracción se ve favorecida en ausencia de NaCl. El método propuesto requiere pequeños volúmenes de muestra y reactivos, pero además, el estudio miniaturizado también es viable obteniendo buenas recuperaciones. En cuanto al sistema de detección, aunque GC-FID es una técnica más robusta, GC-MS es una técnica más sensible y selectiva, ofreciendo LD del orden de pg/L. De modo que, esta última nos permite detectar estos compuestos en agua a los niveles que marca la normativa.

- Se ha demostrado que la aplicación de SPME para la determinación de cloroalcanos (C10-13) en muestras acuosas permite su determinación a bajas concentraciones y de una forma sencilla, rápida y económica, ya que no requiere el empleo de disolventes orgánicos ni reactivos para la modificación de la muestra. En cuanto a la separación y detección, aunque el sistema GC-MS es más selectivo para estas sustancias complejas, el sistema GC- μ ECD ofrecer una mayor sensibilidad, permitiendo determinar estas sustancias a concentraciones menores que los niveles exigidos por la normativa.

- La combinación de LC capilar con detección electroquímica (DE) permite el análisis de fenoles en muestras acuosas sin la necesidad de pasos de preconcentración previos al análisis. El método propuesto ofrece buena sensibilidad y límites de detección comparables con otros trabajos previamente publicados en los que se utilizan técnicas de preconcentración y pretratamientos para las muestras.

6.1.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE BIOTA

- Para la determinación de compuestos organoclorados en muestras de biota se ha propuesto un método de miniaturización basado en la extracción con MSPD y preconcentrando con SPME. Entre los soportes sólidos estudiados en este trabajo, la combinación de C₁₈ como dispersante y Florisil® como retenedor de lípidos combinados con SPME y cromatografía de gases ofrece numerosas ventajas frente a otros métodos de análisis de estos compuestos, como la reducción del tiempo de análisis y las cantidades de reactivos empleadas. Los límites de detección logrados con los métodos analíticos desarrollados son más bajos que las NCA establecidas para hexaclorobenceno y hexaclorobutadieno por la normativa vigente.

- El empleo de MAE para la extracción de cloroalcanos (C10-C13) en muestras de bivalvos utilizando como disolvente hexano:acetona permite la extracción a elevadas recuperaciones. Como pretratamiento de la muestra para eliminar las posibles interferencias, se pudo observar

que el empleo de Florisil no era adecuado, posiblemente debido a que los cloroalcanos (C10-13) quedaban retenidos junto a la fase lipídica. Además, la combinación con SPME mejora la sensibilidad y disminuye el tiempo del análisis ofreciendo recuperaciones del 86%.

- El uso de la extracción mediante baño de ultrasonidos para los compuestos organoestánicos, utilizando ácido acético como solvente ofrece buenas recuperaciones, que combinado con la preconcentración mediante SPME, permite analizar estos compuestos a bajos límites de detección, del orden de ng/g, de manera rápida y sencilla.

6.1.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SEDIMENTO

- De la comparación entre MSPD y USE para la extracción de compuestos organoclorados en muestras de sedimento, se puede concluir que la extracción por MSPD no es viable en este tipo de matriz. El método propuesto, basado en la extracción con ultrasonidos, permite la extracción y el análisis de compuestos organohalogenados con recuperaciones favorables. Es un método sencillo, no requiere grandes cantidades de muestras y reactivos, y permite procesar las muestras en cortos períodos de tiempo.

- Entre las técnicas estudiadas para la extracción de cloroalcanos (C10-C13) en muestras de sedimento, MSPD es la más adecuada ya que ofrece las mejores recuperaciones (93%). Como soporte sólido, el uso de Florisil ofrece buenos resultados cuando la cantidad es la adecuada, un exceso reduce las recuperaciones. Entre los solventes y mezclas testados para la elución, se pudo comprobar que el hexano es el más adecuado. Por otro lado, la preconcentración de los analitos empleando SPME mejora la sensibilidad permitiendo, reducir los límites de detección.

6.2 CONCLUSIONES SOBRE EL ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS PRIORITARIAS EN EL LITORAL DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

6.2.1 AGUAS DE TRANSICIÓN

- Analizando los resultados obtenidos para aguas de transición durante los cuatro años de muestreos se concluye que:

- En la masa 0302 (Salinas de Santa Pola) los compuestos detectados más frecuentemente fueron pentaclorobenceno, endosulfán y dietilhexilftalato. El pentaclorobenceno, a pesar de superar la NCA-MA en el control de vigilancia no volvió a detectarse en los muestreos posteriores. El endosulfán, tras superar la NCA-MA en 2010, disminuyó su concentración por debajo de la norma hasta no llegar a detectarse en 2012. Las concentraciones de dietilhexilftalato fueron descendiendo progresivamente, hasta llegar a un valor medio de 0.2 µg/L, muy por debajo de la NCA-MA.

- En cuanto a la masa 0202 (Estany de Cullera), los compuestos más observados fueron endosulfán y clorpirifós. El endosulfán, tras superar la NCA-MA en 2008-2009 y 2010, disminuyó su concentración en 2011 y 2012 por debajo de la NCA-MA. El clorpirifós, únicamente superó la NCA-MA en 2010. En los años sucesivos (2011 y 2012) no volvió a detectarse este compuesto.

- Con respecto a la masa 0201 (Estuario del río Júcar), los compuestos más destacados fueron endosulfán, difenil-éteres-bromados y dietilhexilftalato. El endosulfán, tras superar la NCA-MA en 2010, disminuyó su concentración en 2011 y 2012, situándose por debajo de la NCA-MA. Los difenil-éteres-bromados, a pesar de superar la NCA-MA en el control de vigilancia no volvieron a detectarse en los muestreos posteriores. Por lo que respecta al dietilhexilftalato, se observa la presencia continuada de este compuesto en todos los muestreos realizados, aunque la media anual en toda la masa fue descendiendo hasta situarse por debajo de la NCA-MA.

Como conclusión general del estado de las aguas de transición de la Comunidad Valenciana, se puede decir que durante el control de vigilancia no superó los objetivos de calidad deseados. Sin embargo, su calidad mejoró en las posteriores campañas de muestreo del control operativo, hasta alcanzar un buen estado químico para las tres masas de agua de transición estudiadas.

6.2.2 AGUAS COSTERAS

Analizando los resultados obtenidos para aguas costeras durante los cuatro años de muestreos se observa una disminución gradual de las concentraciones de los compuestos analizados. Si se analiza detalladamente los compuestos cuyas concentraciones incumplieron las normas de calidad durante el control de vigilancia se observa que:

- El octilfenol sólo superó la NCA-MA en el control de vigilancia en la masa 006. Posteriormente, en 2010 y 2012, no se detectó este compuesto en ninguna de las muestras analizadas.

- El pentaclorobenceno, aunque en el control de vigilancia superó en cinco masas de agua costeras (001, 003, 004, 0041 y 008) la NCA-MA establecida, no se volvió a detectar en ninguna de estas masas de agua.

- El endosulfán únicamente superó la NCA-MA en la masa 006 durante el control de vigilancia. Posteriormente, en los siguientes muestreos, no se detectó este compuesto.

- El hexaclorociclohexano superó la NCA-MA en un punto de muestreo de las masas 001 y 0081. Posteriormente, se ha observado una disminución muy importante en los muestreos sucesivos de estas masas, hasta prácticamente no detectarse en 2012.

- El dietilhexilftalato es el compuesto que aparece con más frecuencia en las aguas costeras. Superó, bien en toda la masa o bien por punto de muestreo, la NCA-MA en 9 masas de agua (001, 004, 0041, 006, 008, 0081, 010, 014 y 016) durante el control de vigilancia. A lo largo de los años se ha observado una reducción tanto en la frecuencia de aparición como en las concentraciones observadas de este compuesto, llegando a situarse por debajo de la NCA-MA.

- Finalmente, el tributilo de estaño únicamente se detectó en la masa 0102 por encima de la NCA-MA. De hecho, este compuesto superó la NCA-MA en dicha masa, en todas las campañas de muestreo realizadas.

En cuanto al estado químico de las aguas costeras de la Comunidad Valenciana se puede concluir que, a pesar de los resultados negativos mostrados para todas las masas de agua estudiadas durante el control de vigilancia, el estado fue mejorando durante el control operativo, permaneciendo afectadas en 2011 sólo dos masas (001 y 0102), y tan sólo una masa en 2012 (0102).

- Analizando los resultados obtenidos para biota durante los cuatro años de muestreos se observa que ninguna de las sustancias con NCA establecida en la Directiva 2008/105/CE supera los valores fijados. Por otra parte, el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión Europea de 19 de diciembre de 2006 regula el contenido máximo de hidrocarburos policíclicos aromáticos en bivalvos destinados al consumo humano, fijando un valor máximo de 10 µg/kg (peso húmedo) para el benzo(a)pireno. Las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos encontradas en biota siempre se situaron muy por debajo del contenido máximo permitido.

- Las sustancias con presencia generalizada en biota son: hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenoles y tributilo de estaño. Cabe destacar la baja frecuencia de aparición del dietilhexilftalato, pese a ser uno de los compuestos más detectado en aguas costeras y presentar un valor elevado de K_{ow} .

- Entre los hidrocarburos aromáticos policíclicos detectados en biota se ha observado que en ambas especies de bivalvos (mejillones y tellinas) de la masa 007, así como en las tellinas de las masas 006 y 0081 predominan los hidrocarburos aromáticos policíclicos de elevado peso molecular respecto de los de bajo peso molecular, por lo que el origen de la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en estas zonas estaría asociado a fuentes pirolíticas. Por otra parte, en los mejillones de las masas 002, 003, 004 y en las tellinas de la masa 0041, predominan claramente los hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular, lo que indicaría que la principal fuente contaminante en estas zonas sería de origen petrogénico.

- En líneas generales se observa una presencia generalizada para las sustancias propensas a la acumulación indicadas en la Directiva 2008/105/CE, presentando una tendencia ascendente en las concentraciones detectadas.

- Analizando los resultados obtenidos para sedimentos, durante los tres años de muestreos se observa una disminución de las concentraciones de pesticidas organoclorados. Por otro lado, el t-nonilfenol y los hidrocarburos aromáticos policíclicos muestran una presencia generalizada en todo el período estudiado. Las concentraciones de t-nonilfenol se mantienen en líneas generales durante el período analizado. Por su parte, los hidrocarburos aromáticos policíclicos muestran una tendencia ligeramente ascendente, especialmente en las masas 006 y 010. La evolución de las concentraciones de tributilo de estaño durante el período estudiado muestran un incremento generalizado de las concentraciones en la campaña de 2011, si bien los valores analizados decrecen en la campaña de 2012. Finalmente, se observa una desaparición de dos de los compuestos analizados: cloroalcanos y dietilhexilfatato, pese a ser este último uno de los compuestos más observado en aguas costeras.

- La información obtenida en sedimentos durante el trienio analizado no permite establecer una tendencia clara y generalizada a la acumulación. Los resultados obtenidos durante el período 2010-2012 permitirán establecer valores de referencia para la posterior evaluación de la tendencia a la acumulación a largo plazo en el sedimento.

ANEXOS

ANEXO I. . NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL

L 348/92

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

24.12.2008

ANEXO I

NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL PARA SUSTANCIAS PRIORITARIAS Y PARA OTROS CONTAMINANTES

PARTE A: NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL (NCA)

MA: media anual

CMA: concentración máxima admisible

Unidad: [µg/l]

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Nº	Nombre de la sustancia	Nº CAS (1)	NCA-MA (2) Aguas superficiales continentales (2)	NCA-MA (2) Otras aguas superficiales	NCA-CMA (3) Aguas superficiales continentales (3)	NCA-CMA (3) Otras aguas superficiales
(1)	Alacloro	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7
(2)	Antraceno	120-12-7	0,1	0,1	0,4	0,4
(3)	Atrazina	1912-24-9	0,6	0,6	2,0	2,0
(4)	Benceno	71-43-2	10	8	50	50
(5)	Difeniléteres bromados (2)	32534-81-9	0,0005	0,0002	no aplicable	no aplicable
(6)	Cadmio y sus compuestos (en función de las clases de dureza del agua) (4)	7440-43-9	≤ 0,08 (Clase 1) 0,08 (Clase 2) 0,09 (Clase 3) 0,15 (Clase 4) 0,25 (Clase 5)	0,2	≤ 0,45 (Clase 1) 0,45 (Clase 2) 0,6 (Clase 3) 0,9 (Clase 4) 1,5 (Clase 5)	≤ 0,45 (Clase 1) 0,45 (Clase 2) 0,6 (Clase 3) 0,9 (Clase 4) 1,5 (Clase 5)
(6 bis)	Tetracloruro de carbono (2)	56-23-5	12	12	no aplicable	no aplicable
(7)	Cloroalcanos C ₁₀₋₁₃	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4
(8)	Clorfeninfos	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3
(9)	Clorpirinfos (Clorpirinfos etil)	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1
(9 bis)	Plaguicidas de tipo ciclodieno Aldrín (2) Dieldrín (2) Endrín (2) Isodrín (2)	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ = 0,01	Σ = 0,005	no aplicable	no aplicable
(9 ter)	DDT total (2) (6)	no aplicable	0,025	0,025	no aplicable	no aplicable
	p,p-DDT (2)	50-29-3	0,01	0,01	no aplicable	no aplicable
(10)	1,2 dicloroetano	107-06-2	10	10	no aplicable	no aplicable
(11)	Diclorometano	75-09-2	20	20	no aplicable	no aplicable
(12)	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	no aplicable	no aplicable
(13)	Diurón	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8
(14)	Endosulfán	115-29-7	0,005	0,0005	0,01	0,004
(15)	Fluoranteno	206-44-0	0,1	0,1	1	1
(16)	Hexaclorobenceno	118-74-1	0,01 (7)	0,01 (7)	0,05	0,05
(17)	Hexaclorobutadieno	87-68-3	0,1 (7)	0,1 (7)	0,6	0,6
(18)	Hexaclorociclohexano	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Nº	Nombre de la sustancia	Nº CAS ⁽¹⁾	NCA-MA ⁽²⁾ Aguas superficiales continentales ⁽²⁾	NCA-MA ⁽²⁾ Otras aguas superficiales	NCA-CMA ⁽⁴⁾ Aguas superficiales continentales ⁽³⁾	NCA-CMA ⁽⁴⁾ Otras aguas superficiales
(19)	Isoproturón	34123-59-6	0,3	0,3	1,0	1,0
(20)	Plomo y sus compuestos	7439-92-1	7,2	7,2	no aplicable	no aplicable
(21)	Mercurio y sus compuestos	7439-97-6	0,05 ⁽⁹⁾	0,05 ⁽⁹⁾	0,07	0,07
(22)	Naftaleno	91-20-3	2,4	1,2	no aplicable	no aplicable
(23)	Níquel y sus compuestos	7440-02-0	20	20	no aplicable	no aplicable
(24)	Nonilfenol (4-Nonilfenol)	104-40-5	0,3	0,3	2,0	2,0
(25)	Octilfenol ((4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol))	140-66-9	0,1	0,01	no aplicable	no aplicable
(26)	Pentaclorobenceno	608-93-5	0,007	0,0007	no aplicable	no aplicable
(27)	Pentaclorofenol	87-86-5	0,4	0,4	1	1
(28)	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) ⁽¹⁰⁾	no aplicable	no aplicable	no aplicable	no aplicable	no aplicable
	Benzo(a)pireno	50-32-8	0,05	0,05	0,1	0,1
	Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	Σ = 0,03	Σ = 0,03	no aplicable	no aplicable
	Benzo(k)fluoranteno	207-08-9				
	Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	Σ = 0,002	Σ = 0,002	no aplicable	no aplicable
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5				
(29)	Simazina	122-34-9	1	1	4	4
(29 bis)	Tetrachloro-ethylene ⁽⁷⁾	127-18-4	10	10	no aplicable	no aplicable
(29 ter)	Tricloroetileno ⁽⁷⁾	79-01-6	10	10	no aplicable	no aplicable
(30)	Compuestos de tributilestaño (Cation de tributilestaño)	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
(31)	Triclorobencenos	12002-48-1	0,4	0,4	no aplicable	no aplicable
(32)	Triclorometano	67-66-3	2,5	2,5	no aplicable	no aplicable
(33)	Trifluralina	1582-09-8	0,03	0,03	no aplicable	no aplicable

⁽¹⁾ CAS: Chemical Abstracts Service.

⁽²⁾ Este parámetro es la norma de calidad ambiental expresada como valor medio anual (NCA-MA). Salvo que se especifique otra cosa, se aplica a la concentración total de todos los isómeros.

⁽³⁾ Las aguas superficiales continentales incluyen los ríos y lagos y las masas de agua artificiales o muy modificadas conexas.

⁽⁴⁾ Este parámetro es la norma de calidad ambiental expresada como concentración máxima admisible (NCA-CMA). Cuando en NCA-CMA se indica «no aplicable», se considera que los valores NCA-MA protegen contra los picos de contaminación a corto plazo en el caso de los vertidos continuos, ya que son significativamente inferiores a los valores calculados sobre la base de la toxicidad aguda.

⁽⁵⁾ Por lo que respecta al grupo de sustancias prioritarias incluidas en los difeniléteres bromados (número 5) que figuran en la Decisión nº 2455/2001/CE, se establece una NCA solo para los congéneres números 28, 47, 99, 100, 153 y 154.

⁽⁶⁾ Por lo que respecta al cadmio y sus compuestos (número 6), los valores de la NCA varían en función de la dureza del agua con arreglo a cinco categorías (Clase 1: < 40 mg CaCO₃/l, Clase 2: de 40 a < 50 mg CaCO₃/l, Clase 3: de 50 a < 100 mg CaCO₃/l, Clase 4: de 100 a < 200 mg CaCO₃/l y Clase 5: ≥ 200 mg CaCO₃/l).

⁽⁷⁾ Esta sustancia no es una sustancia prioritaria sino uno de los «otros contaminantes» para los cuales las NCA son idénticas a las establecidas en la legislación aplicable antes del 13 de enero de 2009.

⁽⁸⁾ El DDT total incluye la suma de los isómeros 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil)-etano (nº CAS 50 29 3; nº UE 200 024 3); 1,1,1-tricloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)-etano (nº CAS 789 02 6; nº UE 212 332 5); 1,1-dicloro-2,2-bis-(p-clorofenil)-etileno (nº CAS 72 55 9; nº UE 200 784 6); y 1,1-dicloro-2,2-bis-(p-clorofenil)-etano (nº CAS 72 54 8; nº UE 200 783 0).

⁽⁹⁾ Si los Estados miembros no aplican la NCA para la biota introducirán una NCA más estricta para las aguas a fin de alcanzar los mismos niveles de protección que la NCA para la biota que figuran en el artículo 3, apartado 2, de la presente Directiva. Notificarán a la Comisión y a los demás Estados miembros, a través del Comité a que se refiere el artículo 21 de la Directiva 2000/60/CE, las razones y el fundamento que les han llevado a adoptar este planteamiento, la NCA alternativa establecida para las aguas, incluidos los datos y la metodología a partir de los cuales se ha obtenido la NCA alternativa, y las categorías de aguas superficiales a las que se aplicarán.

⁽¹⁰⁾ En el grupo de sustancias prioritarias incluidas en los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (número 28), son aplicables todas y cada una de las NCA, es decir, tienen que cumplirse la NCA para el benzo(a)pireno, la NCA para la suma de benzo(b)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno, así como la NCA para la suma de benzo(g,h,i)perileno y de indeno(1,2,3 cd)pireno.

ANEXO II. . LISTADO DE ABREVIATURAS

AcH	Ácido acético
ACN	Acetonitrilo
BDE	Bromo-difenil-éter
BPA	Bisfenol A
CL50	Concentración letal
COP	Compuesto orgánico persistente
DCM	Diclorometano
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE	Disruptor endocrino
DEPH	Dietilhexilftalato
DL50	Dosis letal
DMA	Directiva Marco del Agua
DPhT	Difenilo de estaño
DT50	Período requerido para una disipación por transformación del 50% del compuesto de origen
ECD	Detector de captura de electrones
EtOH	Etanol
EndS	Endosulfán
FBC	Factor de bioacumulación
FID	Detector de ionización de llama
GC	Cromatografía gaseosa
HAP o PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
HCB	Hexaclorobenceno
HCBD	Hexaclorobutadieno
HCH	Hexaclorociclohexano
HS	Espacio de cabeza
IARC	Agencia Internacional de Investigación contra el cáncer
Kow	Coeficiente reparto octanol-agua
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción con microondas
MBT	Monobutilo de estaño
MeOH	Metanol
MPhT	Monofenilo de estaño
MS	Detector de espectrometría de masas
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
NCA	Norma de calidad ambiental
NCA-CMA	Norma de calidad ambiental-concentración máxima admisible
NCA-MA	Norma de calidad ambiental-concentración media anual
OCP	Contaminantes organoclorados
PBDE	Polibromo-difenil-éteres

Anexos

PCP	Pentaclorofenol
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
PeCB	Pentaclorobenceno
SCCP	Cloroalcanos de cadena corta (C10-C13)
SPME	Microextracción en fase sólida
STEB	Tetraetilborato de sodio
T1/2	Tiempo de vida medio
TBT	Tributilo de estaño
TCBI	1,2,3-Triclorobenceno
TCBII	1,2,4-Triclorobenceno
TCBIII	1,3,5-Triclorobenceno
TET	Trietilo de estaño
TPhT	Trifenilo de estaño
USAE	Extracción con ultrasonidos
VOC o COV	Compuesto orgánico volátil

ANEXO III. PUBLICACIONES

L. Segovia-Martínez, A. Bouzas-Blanco, P. Campíns-Falcó, A. Seco-Torrecillas.

Improving detection limits for organotin compounds in several matrix water samples by derivatization-headspace-solid-phase-microextraction and GC-MS.

Talanta, 80 (2010) 1888-1893

L. Segovia-Martínez, A. Bouzas, P. Campíns-Falcó, A. Seco.

A new cost-effective method for estimating short chain chlorinated paraffin in several environmental matrixes: water, biota and sediment

En proceso de revisión

L. Segovia-Martínez, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó.

A direct Capillary Liquid Chromatography with electrochemical detection method for determination of phenols in water samples.

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 7926-7930

Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, C. Molins-Legua, L. Segovia-Martínez, A. Seco-Torrecillas.

Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection.

Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 6741-6745

N. Martí, D. Aguado, L. Segovia-Martínez, A. Bouzas, A. Seco.

Occurrence of priority pollutants in WWTP effluents and Mediterranean coastal waters of Spain.

Marine Pollution Bulletin, 62 (2011) 615-625

Nuria Martí Ortega, Daniel Aguado García, Alberto Bouzas Blanco, Laura Segovia Martínez, Miguel Abargues Llamas, Adela Sevillano Cabeza, Pilar Campíns Falcó, Aurora Seco Torrecillas, José Ferrer Polo.

Alquilfenoles e hidrocarburos aromáticos policíclicos en bivalvos de las costas de la Comunidad Valenciana.

Tecnología del agua, 312 (2009) 40-48

