



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS AL
ANÁLISIS DE AGUAS DE CONSUMO Y RESIDUALES**

Autor: PABLO ROHNER HERNÁNDEZ

Tutor: D. ANTONIO ZAPARDIEL PALENZUELA

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS
SEPTIEMBRE 2018**

AGRADECIMIENTOS

♣ A mi tutor de Trabajo Fin de Máster el Dr. Antonio Zapardiel Palenzuela, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de este trabajo, por haberme proporcionado la oportunidad de profundizar en el estudio de las técnicas cromatográficas.

♣ A mi familia, por su incondicional y valioso apoyo. Sus consejos fueron el motor de arranque y mi constante motivación, muchas gracias por su paciencia y comprensión.

RESUMEN

El análisis del agua, ya sea destinada al consumo o residual, es una actividad imprescindible para garantizar la integridad de los ecosistemas hídricos y la salud de los consumidores. Dentro de la gran cantidad de parámetros que se evalúan para determinar la calidad del agua, existen grandes grupos de analitos que pueden determinarse utilizando las técnicas cromatográficas. La legislación aplicable a calidad de las aguas es cada vez más exigente, los valores paramétricos tienden a mantenerse o a disminuir en función de estudios y recomendaciones de organismos oficiales dedicados a preservar la salud y el medio ambiente. Asimismo, para garantizar la calidad de los resultados emitidos por los laboratorios, se han de cuidar todos los aspectos relacionados con el muestreo, conservación y tratamiento de la muestra.

Habitualmente el análisis cromatográfico de muestras de agua requiere un tratamiento previo de la muestra, debido a que los analitos de interés se encuentran en concentraciones bastante bajas y/o acompañados de interferentes que deben eliminarse antes del análisis. En función de la naturaleza del analito, se debe seleccionar la técnica analítica más adecuada. En este estudio se presentan algunas investigaciones recientes relacionadas con el análisis cromatográfico de muestras de agua, haciendo especial mención a los métodos de extracción, instrumentación y condiciones cromatográficas utilizadas y sistemas de detección. También se incluyen estudios de validación de métodos cromatográficos, donde se reportan resultados de linealidad, veracidad, precisión, sensibilidad y demás parámetros de validación de interés.

En definitiva, este trabajo fin de máster refleja la situación actual de las técnicas cromatográficas en los laboratorios de análisis de aguas.

ABSTRACT

The analysis of water, whether intended for consumption or waste, is an essential activity to ensure the integrity of water ecosystems and consumer's health. Among the large number of parameters that are assessed to determine water quality, there are many groups of analytes that can be determined using chromatographic techniques. Applicable water legislation is becoming more and more strict, parametric values tend to be maintained or decreased depending on studies and recommendations from organizations dedicated to preserve human health and the environment. Likewise, in order to guarantee quality results issued by the laboratory, all facts related to sampling, sample treatment and conservation must be watched.

Usually chromatographic analysis of water samples require a preliminary sample treatment, due to the fact that analytes of interest are in quite low concentrations and / or accompanied by interferences that must be removed before the analysis. Depending on the nature of the analyte, the most appropriate analytical technique should be selected. In this project some recent investigations related to the chromatographic analysis of water samples are presented, making special mention to extraction methods, instrumentation and chromatographic conditions employed and detection systems. Chromatographic methods validation studies are also included, where results of linearity, precision, accuracy, sensitivity and other validation parameters of interest are reported.

Moreover, this master's thesis reflects the current situation of chromatographic techniques in water analysis laboratories.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **2,4,6-TCA:** 2,4,6-tricloroanisidol.
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **AED:** detector de emisión atómica.
- **ANOVA:** herramienta estadística de análisis de la varianza.
- **BOE:** Boletín Oficial del Estado.
- **BTEX:** benceno, tolueno, etilbenceno y xileno.
- **C18:** fase estacionaria empleada en cromatografía constituida a base de octadecilsilano.
- **COD:** carbono orgánico disuelto.
- **COV / VOC:** compuestos orgánicos volátiles (VOC de sus siglas en inglés).
- **DAD:** detector de diodos en serie.
- **DBO₅:** demanda biológica de oxígeno a los cinco días.
- **DHS:** espacio en cabeza dinámico.
- **DI:** técnica de extracción con inmersión directa en la muestra.
- **DLLME:** microextracción líquido-líquido dispersiva.
- **DPH:** dominio público hidráulico.
- **DQO:** demanda química de oxígeno.
- **ECD:** detector de captura electrónica.
- **EDAR:** estación depuradora de aguas residuales.
- **ERAR:** estación de regeneración de aguas residuales.
- **ETAP:** estación de tratamiento de agua potable.
- **FIA:** análisis por inyección en flujo.
- **GC:** cromatografía de gases.
- **GSM:** geosmina.
- **HAP / PAH:** hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH de sus siglas en inglés).
- **HF:** extracción con empleo de fibra hueca.
- **MMLLE:** extracción líquido-líquido en membrana microporosa.
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia.
- **HS:** técnica de “*headspace*” o espacio en cabeza utilizado en cromatografía de gases.
- **IC:** cromatografía iónica.
- **IEC:** cromatografía de exclusión de iones.
- **IPC:** cromatografía de emparejamiento de iones.
- **IS:** patrón interno.

- **ISO:** organización internacional de normalización.
- **LA:** variante de microcistina con presencia de aminoácidos de leucina y alanina.
- **LC:** cromatografía líquida.
- **LD:** desorción líquida.
- **LD₅₀:** dosis letal para el 50 % de la población.
- **LLE:** extracción líquido-líquido.
- **LLME:** microextracción líquido-líquido.
- **LOD:** límite de detección.
- **LOQ:** límite de cuantificación.
- **LR:** variante más común de microcistina con presencia de aminoácidos de leucina y arginina.
- **MC:** microcistina.
- **MIB:** 2-metilisoborneol.
- **MDGC:** cromatografía de gases multidimensional.
- **MLOQ:** límite de cuantificación de un método analítico.
- **MS:** detector de espectrometría de masas.
- **MS/MS:** detector de espectrometría de masas en tándem.
- **m/z:** relación masa/carga de un ion generado en un equipo de espectrometría de masas.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **pKa:** logaritmo cambiado de signo de la constante de disociación ácida de un ácido débil.
- **PLE:** extracción líquida presurizada.
- **ppm:** concentración expresada en partes por millón (10^{-6}).
- **ppt:** concentración expresada en partes por trillón (10^{-12}).
- **3Q:** detector de masas de triple cuadrupolo.
- **QTOF:** detector de cuadrupolo con tiempo de vuelo.
- **RD:** Real Decreto.
- **RP-C18:** fase estacionaria inversa, constituida a base de octadecano.
- **RPLC:** cromatografía líquida en fase inversa (reversa).
- **RR:** variante de microcistina con doble presencia del aminoácido arginina.
- **RSD:** desviación estándar relativa (parámetro estadístico).
- **RT:** tiempo de retención.
- **SA:** extracción asistida por surfactantes.
- **SBSE:** extracción sobre barra en agitación.
- **SCF:** fluido supercrítico.

- **SDME:** microextracción por gota única.
- **SFC:** cromatografía de fluidos supercríticos.
- **SFE:** extracción mediante fluidos supercríticos.
- **SIM:** monitoreo en modo de ion seleccionado (espectrometría de masas).
- **SIS:** sistema integral de saneamiento.
- **SPE:** extracción en fase sólida.
- **SPME:** microextracción en fase sólida.
- **SRM:** detector de masas operando en modo control de reacción seleccionado.
- **TCA:** tricloroanisol.
- **TD:** desorción térmica.
- **THM:** trihalometano.
- **TOF:** detección por tiempo de vuelo utilizada en espectrometría de masas.
- **UPLC:** cromatografía de líquidos de ultra-elevada resolución.
- **U:** representa la incertidumbre en el contexto de los métodos analíticos.
- **USA-EME:** microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos.
- **UV:** radiación perteneciente a la región ultravioleta del espectro electromagnético.
- **VIS:** radiación perteneciente a la región visible del espectro electromagnético.
- **YR:** variante de microcistina con presencia de aminoácidos de triptófano y arginina.

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
Figura 1.- Esquema del ciclo hidrológico o ciclo del agua.....	3
Figura 2.- Esquema del ciclo integral del agua.....	14
Figura 3.- Fibras empleadas en la SPME (fotografía y esquema).....	25
Figura 4.- Dispositivo de LLE (Dean-Stark).....	27
Figura 5.- Diagrama de las partes que componen un cromatógrafo de gases.....	30
Figura 6.- La separación de analitos durante el proceso cromatográfico.....	31
Figura 7.- Fases estacionarias empleadas en IC.....	32
Figura 8.- Clasificación de los métodos de detección utilizados en IC.....	34
Figura 9.- Efecto de la mezcla de disolventes de extracción/dispersión.....	40
Figura 10.- Efecto de la proporción de mezcla de disolvente extractante/dispersante.....	40
Figura 11.- Efecto del volumen de mezcla de disolvente extractante/dispersante....	41
Figura 12.- Flujo de trabajo empleado en el análisis de cribado empleando GC-QTOF MS.....	42
Figura 13.- Estructuras, abreviaturas y pesos moleculares de los 26 antibióticos estudiados.....	44
Figura 14.- Efecto del pH del extracto final en la sensibilidad de la detección.....	47
Figura 15.- Esquema de un sistema de IC utilizado para determinar NO_3^- y NO_2^- en agua.....	51

Figura 16.- Efecto del tiempo de irradiación UV sobre la intensidad de la quimioluminiscencia.....	52
Figura 17.- Efecto del pH sobre la intensidad de la quimioluminiscencia.....	52
Figura 18.- Efecto del modificador sobre la intensidad de la quimioluminiscencia de los analitos y del ruido de fondo.....	53

ÍNDICE DE TABLAS Y ECUACIONES

PÁGINA

Ecuación 1.- Expresión de la constante de distribución o reparto.....	26
Tabla 1.- Parámetros químicos y valores paramétricos establecidos en el anexo I del RD140/2003.....	10
Tabla 2.- Parámetros químicos que se controlan según las especificaciones del producto y valores paramétricos establecidos en el anexo I del RD140/2003.....	11
Tabla 3.- Parámetros indicadores y valores paramétricos establecidos en el anexo I del RD140/2003.....	12
Tabla 4.- Anexo I del RD 1620/2007. Parámetros microbiológicos y contaminantes a determinar en muestras de aguas regeneradas.....	14
Tabla 5.- Anexo 2 del DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento.....	16
Tabla 6.- Anexo 4 del DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento.....	17
Tabla 7.- Descripción del olor y valores umbrales de detección sensorial de compuestos productores de olor presentes en aguas.....	36
Tabla 8.- Metodologías de microextracción para el análisis de compuestos productores de olor en agua.....	38
Tabla 9.- Condiciones cromatográficas de la separación.....	45
Tabla 10.- Condiciones optimizadas para la detección, RT, LOQ de los analitos y de los patrones internos.....	46

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS Y ECUACIONES.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- EL AGUA.....	1
1.1.1.- Clasificación de las aguas según su origen.....	2
1.1.2.- Recursos hídricos, contaminación de las aguas y sus efectos sobre el medio ambiente y la salud.....	4
1.1.2.1.- Compuestos orgánicos volátiles.....	4
1.1.2.2.- Pesticidas.....	5
1.1.2.3.- Productores de olor.....	5
1.1.2.4.- Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	6
1.1.2.5.- Índice de hidrocarburos.....	6
1.1.2.6.- Acrilamida.....	7
1.1.2.7.- Microcistinas.....	7
1.1.2.8.- Aniones y cationes.....	7
1.1.2.9.- Antibióticos y otros fármacos.....	8
1.2.- NORMATIVA Y LEGISLACIÓN APLICABLE A LA CALIDAD DE LAS AGUAS.....	9
1.2.1.- Aguas de consumo.....	9
1.2.2.- Aguas regeneradas.....	13
1.2.3.- Aguas residuales.....	15

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO.....	18
3. PARTE TEÓRICA.....	19
3.1.- EL MUESTREO EN AGUAS.....	19
3.1.1.- Requisitos generales del muestreo.....	19
3.1.2.- Requisitos particulares del muestreo.....	20
3.1.2.1.- Llenado del frasco.....	20
3.1.2.2.- Empleo de muestras compuestas.....	20
3.1.2.3.- Filtrado de las muestras.....	20
3.2.- CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUAS PARA REALIZAR ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.....	21
3.2.1.- Consideraciones generales relativas a la conservación de las muestras.....	21
3.2.2.- Transporte de las muestras.....	21
3.2.3.- Identificación de las muestras.....	22
3.2.4.- Recepción de las muestras en el laboratorio.....	22
3.2.5.- Almacenamiento de las muestras en el laboratorio.....	22
3.3.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EMPLEADOS EN CROMATOGRAFÍA.....	23
3.3.1.- Extracción sólido-líquido (SPE).....	23
3.3.2.- Microextracción en fase sólida (SPME).....	24
3.3.3.- Extracción líquido-líquido (LLE).....	26
3.3.4.- Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	27
3.3.5.- Extracción con fluidos supercríticos (SFE).....	28
3.4.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS EN LOS LABORATORIOS DE ANÁLISIS DE AGUAS.....	29
3.4.1.- Cromatografía de gases (GC).....	29
3.4.2.- Cromatografía líquida (LC).....	30
3.4.2.1.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	31

3.4.2.2.- Cromatografía iónica (IC).....	32
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
4.1.- TRABAJOS SELECCIONADOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	35
4.1.1.- Técnicas de extracción utilizadas en determinaciones de compuestos productores de olor.....	35
4.1.2.- Técnicas de extracción utilizadas en determinaciones de contaminantes emergentes en matrices acuosas.....	39
4.2.- TRABAJOS SELECCIONADOS SOBRE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE AGUAS	42
4.2.1.- Determinación de pesticidas en aguas residuales.....	42
4.2.2.- Determinación de fármacos en aguas naturales y aguas residuales.....	43
4.2.3.- Determinación de microcistinas en aguas naturales.....	48
4.2.4.- Determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales y de consumo.....	50
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
6. CONCLUSIONES.....	59
7. BIBLIOGRAFÍA.....	60

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL AGUA ¹

El agua (H₂O) es un compuesto covalente formado por la unión de un átomo de oxígeno con dos átomos de hidrógeno. A diferencia de la mayoría de las combinaciones hidrogenadas de elementos no metálicos, es líquida a presión y temperatura ambiente. Por debajo de cero grados Celsius y a presión de 1 atm, el agua se solidifica y se transforma en hielo. Esta estructura es menos compacta que el estado líquido, por lo que es de las pocas sustancias que su estado sólido flota en su estado líquido. Esto es debido a los enlaces de hidrógeno, que crean cuatro interacciones sobre cada molécula de agua en estado sólido, frente a las 3,59 interacciones que se forman en agua líquida a 25°C. A partir de 100°C y a presión de 1 atm, los puentes de hidrógeno se rompen, desaparecen por tanto las fuerzas intermoleculares y las moléculas de agua separadas y en desorden pasan al estado de vapor (gas).

El agua es un compuesto indispensable para la vida, y ello es debido a una serie de propiedades características sin las cuales no podría concebirse la vida, o no al menos tal y como se conoce. El poder disolvente del agua es una de ellas, el agua disuelve un gran número de moléculas polares e iones; es por tanto un medio de transporte idóneo para biomoléculas y oligoelementos esenciales. La capacidad de cohesión (unión a sí misma) y adhesión (unión a otras moléculas) del agua también es una característica reseñable, da lugar a fenómenos de capilaridad que son utilizados en la naturaleza, por ejemplo, para el transporte de nutrientes en vegetales de gran altura. El calor específico del agua también es otra propiedad a destacar, con un valor de 4,186 J/g°C, presenta una considerable resistencia al calentamiento/enfriamiento, que es una cualidad importante a la hora de preservar a los ecosistemas de las inclemencias del tiempo.

Entre las características fisicoquímicas del agua aquí mencionadas conviene prestar especial atención a su elevado poder disolvente. Esta cualidad, además de suponer una importante ventaja sobre la que se asienta la vida, la convierte en un medio idóneo para contener a multitud de especies químicas que representan una amenaza para los consumidores y/o para el medio ambiente.

1.1.1.- Clasificación de las aguas según su origen ^{2,3}

Este trabajo trata sobre el análisis de las aguas naturales, de consumo y residuales. A continuación, se procederá a clasificar las masas de agua presentes en la Tierra atendiendo al origen.

Aguas marinas: representan la forma mayoritaria de agua del planeta Tierra, en torno al 96,5% del total de la masa de agua.

Aguas glaciares: son la mayor fuente de agua dulce existente, representan más del 75% del total. En la actualidad, en torno a un 10% de la Tierra está cubierta de glaciares.

Aguas continentales: son aguas que se encuentran en la superficie terrestre, y pueden ser de distinta naturaleza:

- Aguas subterráneas: son aguas que discurren o están almacenadas bajo la superficie terrestre. Pueden permanecer inalteradas durante miles de años (agua fósil). Pueden ser destinadas para el consumo, y suelen obtenerse mediante la construcción de pozos.
- Aguas de reservorio: son aguas estáticas que están contenidas en lagos, lagunas, embalses, pantanos, etc.
- Aguas fluviales: se encuentran en continuo movimiento, discurren por ríos, arroyos, canales...

Aguas contenidas en la atmósfera: no representan una proporción demasiado elevada del total de agua dulce, constituyen en realidad una vía de transformación de un tipo de aguas en otro. Forman agregados (nubes) que pueden transformarse en las formas anteriores a partir de las precipitaciones.

La cantidad total de agua existente en el planeta es constante, y se estima un volumen total de 1386 millones de km³.

La *Figura 1* ilustra el ciclo del agua en la Tierra, que consiste básicamente en sucesivas transformaciones de las diferentes formas de agua que se han clasificado anteriormente.



<https://agua.org.mx/que-es>

Figura 1. Esquema del ciclo hidrológico o ciclo del agua.

1.1.2.- Recursos hídricos, contaminación de las aguas y sus efectos sobre el medio ambiente y la salud

Los recursos hídricos son un aspecto fundamental a controlar en la infraestructura de cualquier país. Gran parte de las enfermedades relacionadas con el consumo de agua, que actúa como vector de propagación de estas, se relacionan con el grado de desarrollo y el manejo de los recursos hídricos. La contaminación de las aguas puede tener orígenes muy diversos y las consecuencias de ello son, entre otras, efectos adversos sobre la salud de los consumidores. La construcción de represas, las obras de irrigación, las actividades industriales y el escaso control de las inundaciones suelen ser la causa de bastantes focos de enfermedades. ^{4,5}

Muchos de los contaminantes de las aguas, tanto de aquellas que son destinadas al consumo como de aquellas que se depuran tras su utilización y se vierten de nuevo al DPH, pueden ser determinados por métodos cromatográficos. A continuación, se describirán los contaminantes más típicos en aguas que pueden determinarse mediante técnicas cromatográficas, así como sus efectos nocivos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana.

1.1.2.1.- Compuestos orgánicos volátiles (COV): son compuestos orgánicos que se convierten fácilmente en vapores o gases. Además de carbono, contienen otros elementos como hidrógeno, oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno. Tienen efectos nocivos sobre la salud humana y sobre los ecosistemas naturales debido a su toxicidad, efectos carcinógenos y neurotóxicos. Interfieren en la actividad fotosintética, en el crecimiento y el metabolismo general de las plantas. En animales y seres humanos, su principal riesgo deriva de su carácter liposoluble, es decir una vez que se introducen en el organismo presentan afinidad por los tejidos grasos y no suelen disolverse en agua, aunque algunos productos resultantes de su metabolismo sí presentan un carácter hidrosoluble. Tras la absorción, el contaminante pasa a la sangre, distribuyéndose por los distintos órganos, donde tiende a acumularse. Algunos estudios de toxicidad relacionan ciertas lesiones neurológicas con la exposición crónica a los disolventes (muchos de ellos COVs), además de otros efectos psiquiátricos significativos como la irritabilidad y dificultades de concentración, afectación visual, verbal o motora, pérdida de memoria, etc. ⁶

1.1.2.2.- Pesticidas: son sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a combatir las plagas originadas por animales o cualquier otro organismo, el crecimiento de ciertos vegetales o simplemente concebidos para garantizar la adecuada conservación de un alimento o un determinado ambiente. Algunos de los principales efectos indeseados de estos compuestos son: corrosión, irritación, fácil deflagración o explosión. La clasificación toxicológica en categorías de peligrosidad de los pesticidas se lleva a cabo mediante la dosis letal al 50 por ciento (LD_{50}), que determina la cantidad máxima admisible por kg de peso que un individuo puede tolerar. Desde el punto de vista de su constitución química, los pesticidas pueden clasificarse en diversos grupos, siendo los más importantes los siguientes:

- Arsenicales.
- Carbamatos.
- Derivados de cumarina.
- Derivados de urea.
- Dinitrocompuestos.
- Organoclorados.
- Organofosforados.
- Organometálicos.
- Piretroides.
- Tiocarbamatos.
- Triazinas.

En función de la vía de absorción, cabe considerar tanto efectos locales, producidos sobre la parte del cuerpo directamente expuesta, como efectos sistémicos, que se manifiestan en determinados órganos tras la absorción del producto. También pueden observarse efectos agudos y efectos crónicos, de acuerdo con la evolución en el tiempo de sus manifestaciones. ⁷

1.1.2.3.- Productores de olor: son sustancias presentes en el agua que son responsables de los olores que pueden desprender. Las algas y las bacterias son las principales causas de problemas con el olor y el sabor del agua potable. Sin embargo, los vertidos químicos y de aguas residuales también generan productos químicos que pueden alterar el olor y el sabor, tanto en aguas superficiales como

en aguas subterráneas. El agua también puede oler a tierra, moho, productos químicos o cloro. Las células de algunas algas y bacterias generan de forma natural productos químicos con olor, como la Geosmina (trans-1, 10-dimetiltrans-9-decalol) o el MIB (2-metilisoborneol). La Geosmina es producida sobre todo por *Streptomyces coelicolor* (actinobacteria) y otras cianobacterias. El MIB es producido por cianobacterias, como por ejemplo especies del género *Anabaena*.⁸

1.1.2.4.- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman principalmente durante la combustión incompleta de materia orgánica como el carbón, petróleo, gasolina y basuras, así como otras sustancias orgánicas (tabaco, carne preparada en la parrilla, etc.). Los HAPs se encuentran generalmente como una mezcla de dos o más de estos compuestos. Los HAPs presentes en las aguas pueden proceder de la contaminación medioambiental (actividades industriales, calefacciones, incendios forestales, etc.) y de procesos que incluyan el ahumado, secado o incluso el calentamiento de cualquier producto.

De forma general, los HAPs pueden provocar efectos irritantes por contacto de la piel y los ojos, fallos respiratorios cuando se inhalan y afectación del sistema nervioso. A largo plazo por ingestión pueden causar problemas de coagulación y del sistema inmunitario por disminución de las plaquetas y los leucocitos, respectivamente. Además, existen estudios que confirman que algunos HAPs pueden causar cáncer en animales o incluso en humanos, como el benzopireno, que ha sido clasificado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como agente carcinógeno para los seres humanos.⁹

1.1.2.5.- Índice de hidrocarburos: Es una medida de la contaminación de las aguas por hidrocarburos en los sistemas de almacenamiento, en las fuentes de abastecimiento subterráneas y superficiales, así como en otros emplazamientos. Es un hecho que tiene lugar como consecuencia de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento del crudo de petróleo y sus derivados. También existen acuíferos afectados por derrames en plantas industriales, fugas en grandes tuberías de descarga, perforaciones en tuberías y depósitos de hidrocarburos, etc. Los cauces de los ríos pueden verse contaminados por hidrocarburos por vertidos que los contengan, y cuya depuración no ha resultado eficaz.⁶

1.1.2.6.- Acrilamida: La acrilamida aparece en los coagulantes de poliacrilamida utilizados en el tratamiento del agua de consumo, que contienen concentraciones residuales de monómero de acrilamida. Las poliacrilamidas se utilizan también como agentes cementantes en la construcción de pozos y embalses de agua de consumo. Las personas pueden estar expuestas a concentraciones adicionales de origen alimentario, por el uso de poliacrilamida en el procesado de los alimentos y debido a la posible formación de acrilamida en alimentos cocinados a temperaturas altas. La acrilamida es neurotóxica, afecta a las células germinales y altera la función reproductora. En estudios de mutagenia, la acrilamida ha demostrado introducir mutaciones genéticas en células de mamíferos, así como alteraciones cromosómicas in vitro e in vivo. En estudios de carcinogenia a largo plazo, ratas expuestas a la acrilamida por medio del agua de bebida desarrollaron tumores de escroto, de tiroides y suprarrenales en machos; tumores de mama, de tiroides y de útero en hembras. Datos recientes han mostrado que la exposición a la acrilamida mediante el consumo de alimentos cocinados es muy superior a lo que se había considerado en un pasado, pero aún no se ha determinado la importancia de esta información nueva en lo que respecta a la evaluación de riesgos. ¹⁰

1.1.2.7.- Microcistinas: La peligrosidad de los afloramientos de cianobacterias radica en la capacidad que tienen ciertos géneros de estas bacterias de producir toxinas patógenas para el ser humano. La toxina más común y peligrosa es la microcistina, la cual es producida por los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* y *Anabaenopsis*. Se estima que alrededor de un 50% de los afloramientos son tóxicos. Las microcistinas tienen carácter hepatotóxico, su exposición continuada tiene un efecto carcinogénico directo sobre el hígado. Una vez acumulada la toxina en el hígado, promueven la desorganización del citoesqueleto, peroxidación de lípidos, pérdida de la integridad de la membrana plasmática, fragmentación del ADN, apoptosis y finalmente necrosis. A nivel estructural, las microcistinas son péptidos cíclicos compuestos por aminoácidos naturales y no naturales. Son muy estables y termorresistentes existiendo más de 100 variedades distintas. Las más frecuentes son: LR, RR, LA y YR. ¹¹

1.1.2.8.- Aniones y cationes: La presencia de aniones y cationes en el agua, ya sea en su forma bruta tras la captación, después de su tratamiento para el consumo o al finalizar el proceso de depuración para ser devuelta al DPH, es totalmente normal. Sin embargo, existen ciertas concentraciones que no deben ser superadas,

especialmente en el agua destinada al consumo, para evitar problemas de salud. Del mismo modo, puede suceder que ciertos iones metálicos y ciertos oxoaniones estén presentes en las aguas, especialmente en aguas residuales de origen industrial, y que tienen un efecto potencialmente dañino para el medio ambiente. La cromatografía de intercambio iónico (cromatografía iónica) es una técnica perteneciente a la cromatografía líquida que es capaz de separar a los iones en función de su carga, y que se emplea habitualmente en el análisis de aguas. El análisis de las muestras que contengan a estos iones puede realizarse por medio de otras técnicas, como son los electrodos selectivos que ofrecen las técnicas electroquímicas o los métodos espectroscópicos y espectrométricos. Sin embargo, en este trabajo solo se hará alusión a la cromatografía iónica (IC) para realizar estas determinaciones. ^{1,12}

1.1.2.9.- Antibióticos y otros fármacos: Los antibióticos y otros fármacos, incluidos los de uso humano y veterinario, se agrupan dentro de los denominados contaminantes emergentes. Gracias al desarrollo de las técnicas analíticas, donde se ha mejorado notablemente la sensibilidad de los equipos, ha sido posible que hoy en día se detecten este tipo de contaminantes en las aguas. Las concentraciones a las que pueden llegar estos fármacos en una muestra de agua son del orden de la traza (ppm o mg/kg) y más frecuentemente de la ultratrazas (ppt o µg/kg). Aparte de los antibióticos, los fármacos más comúnmente detectados en aguas son: analgésicos y antiinflamatorios, antiepilépticos, β-bloqueantes, medios de contraste empleados en técnicas de rayos, reguladores lipídicos, hormonas y esteroides. En general los fármacos no son persistentes, pero dado que se vierten de manera continua y los sistemas convencionales de depuración no son capaces de eliminarlos, las empresas dedicadas a la gestión del agua cuentan con el reto de desarrollar nuevos sistemas de eliminación. ¹³

1.2. NORMATIVA Y LEGISLACIÓN APLICABLE A LA CALIDAD DE LAS AGUAS

En este capítulo se van a tratar los requerimientos normativos y legislativos que sean de aplicación a la calidad de las aguas. Se va a realizar una división de esta matriz en tres grupos, atendiendo a su tipología, a su fin previsto y a la propia naturaleza del ciclo integral del agua; estos son: aguas de consumo, aguas regeneradas y aguas residuales.

Los documentos a los que se hace referencia en este apartado del trabajo son de aplicación en España, sin que esto excluya que puedan llegar a aplicarse en otros territorios de países diferentes. Es importante destacar que la legislación en materia del medio ambiente es cambiante, adaptándose a los avances científicos que van sucediéndose y los acuerdos internacionales que apliquen en cada caso.

1.2.1.- Aguas de consumo

Las aguas de consumo más propiamente conocidas como aguas de consumo humano deben cumplir como requisito indispensable ser salubres y limpias. Esto es, no contener microorganismos patógenos ni otros contaminantes a niveles capaces de afectar adversamente la salud de los consumidores. España cuenta con abastecimientos de alta calidad y rigurosos sistemas de vigilancia y de control analítico, que hacen posible que el agua llegue en buenas condiciones a los hogares y demás puntos de abastecimiento y sea consumida con seguridad. Para ello, el agua es sometida previamente a un tratamiento de potabilización en las ETAP y a diversos controles sanitarios.

La Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, establece la obligación de las administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades. Además, el ordenamiento jurídico español incorpora la Directiva Comunitaria 80/778/CEE de 15 de julio de 1980, sobre calidad de agua destinada al consumo humano. Esta directiva incluye reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de las aguas potables de consumo público. Como adaptación al progreso científico y técnico de esta Directiva, se ha promulgado la vigente Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Su incorporación al derecho interno se realiza mediante el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. ¹⁴

Es precisamente el RD 140/2003 el documento sobre el que se centrará este epígrafe, ya que establece, entre otros requisitos, cuáles son los contaminantes que se deben monitorizar, así como los niveles paramétricos (concentraciones máximas que se admiten para poder considerar a una masa de agua como apta para el consumo). En el anexo I del RD 140/2003, que reproduzco por su relevancia para este trabajo en las *Tablas 1, 2 y 3*, se especifican los parámetros y los valores paramétricos:

Tabla 1. *Parámetros químicos y valores paramétricos establecidos en el anexo I del RD140/2003.* ¹⁵

B.1 Parámetros químicos

Parámetro	Valor paramétrico
4. Antimonio	5,0 µg/l
Hasta el 31/12/2003	10,0 µg/l
5. Arsénico	10 µg/l
Hasta el 31/12/2003	50 µg/l
6. Benceno	1,0 µg/l
Hasta el 31/12/2003	- µg/l
7. Benzo(a)pireno	0,010 µg/l
8. Boro	1,0 mg/l
9. Bromato:	
A partir de 01/01/2009	10 µg/l
De 01/01/2004 a 31/12/2008	25 µg/l
Hasta el 31/12/2003	- µg/l
10. Cadmio	5,0 µg/l
11. Cianuro	50 µg/l
12. Cobre	2,0 mg/l
13. Cromo	50 µg/l
14. 1,2-Dicloroetano	3,0 µg/l
Hasta el 31/12/2003	- µg/l
15. Fluoruro	1,5 mg/l
16. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA)	0,10 µg/l
Suma de:	
Benzo(b)fluoranteno	µg/l
Benzo(ghi)perileno	µg/l
Benzo(k)fluoranteno	µg/l
Indeno(1,2,3-cd)pireno	µg/l
17. Mercurio	1,0 µg/l
18. Microcistina	1 µg/l
Hasta el 31/12/2003	- µg/l
19. Níquel	20 µg/l
Hasta el 31/12/2003	50 µg/l

20. Nitrato	50 mg/l
21. Nitritos:	
Red de distribución	0,5 mg/l
En la salida de la ETAP/depósito 0,1 mg/l	0,1 mg/l
22. Total de plaguicidas	0,50 µg/l
23. Plaguicida individual	0,10 µg/l
Excepto para los casos de:	
Aldrín	0,03 µg/l
Dieldrín	0,03 µg/l
Heptacloro	0,03 µg/l
Heptacloro epóxido	0,03 µg/l
24. Plomo:	
A partir de 01/01/2014	10 µg/l
De 01/01/2004 a 31/12/2013	25 µg/l
Hasta el 31/12/2003	50 µg/l
25. Selenio	10 µg/l
26. Trihalometanos (THMs): Suma de:	
A partir de 01/01/2009	100 µg/l
De 01/01/2004 a 31/12/2008	150 µg/l
Hasta el 31/12/2003	- µg/l
Bromodiclorometano	µg/l
Bromoformo	µg/l
Cloroformo	µg/l
Dibromoclorometano	µg/l
27. Tricloroeteno + Tetracloroeteno	10 µg/l
Hasta el 31/12/2003	- µg/l
Tetracloroeteno	µg/l
Tricloroeteno	µg/l

Tabla 2. *Parámetros químicos que se controlan según las especificaciones del producto y valores paramétricos establecidos en el anexo I del RD140/2003.* ¹⁵

B.2 Parámetros químicos que se controlan según las especificaciones del producto

Parámetro	Valor paramétrico
28. Acrilamida	0,10 µg/l
29. Epiclorhidrina	0,10 µg/l
30. Cloruro de vinilo	0,50 µg/l

Estos valores paramétricos corresponden a la concentración monomérica residual en el agua, calculada con arreglo a las características de la migración máxima del polímero correspondiente en contacto con el agua.

Tabla 3. *Parámetros indicadores y valores paramétricos establecidos en el anexo I del RD140/2003.* ¹⁵

C. Parámetros indicadores

Parámetro	Valor paramétrico	
31. Bacterias coliformes	0 UFC	En 100 ml
32. Recuento de colonias a 22 °C		
A la salida de ETAP	100 UFC	En 1 ml
En red de distribución	Sin cambios anómalos	
33. Aluminio	200	µg/l
34. Amonio	0,50	mg/l
35. Carbono orgánico total	Sin cambios anómalos	mg/l
36. Cloro combinado residual	2,0	mg/l
37. Cloro libre residual	1,0	mg/l
38. Cloruro	250	mg/l
39. Color	15	mg/l Pt/Co
40. Conductividad	2.500	µS/cm a 20 °C
41. Hierro	200	µg/l
42. Manganeso	50	µg/l
43. Olor	3 a 25 °C	Índice de dilución
44. Oxidabilidad	5,0	mg O ₂ /l
45. pH:		
Valor paramétrico mínimo	6,5	Unidades de pH
Valor paramétrico máximo	9,5	Unidades de pH
46. Sabor	3 a 25 °C	Índice de dilución
47. Sodio	200	mg/l
48. Sulfato	250	mg/l
49. Turbidez:		
A la salida de ETAP y/o depósito	1	UNF
En red de distribución	5	UNF

Los parámetros de las *Tablas 1, 2 y 3* que aparecen destacados en negrita son los que afectan a este estudio, ya que pueden ser determinados mediante técnicas cromatográficas. De los parámetros cuyo valor paramétrico ha ido cambiando a lo largo del tiempo, se ha destacado el que es de aplicación en la actualidad.

1.2.2.- Aguas regeneradas

Una vez que es utilizada el agua de consumo, esta se elimina por los desagües. En ese momento se convierte en agua residual y la red de saneamiento la conduce a las EDAR. Estas aguas están sucias a su llegada a las EDAR y no se pueden verter directamente a los ríos porque los contaminarían perjudicando seriamente a los ecosistemas. En las EDAR, se aplican varios tratamientos a las aguas residuales para dejarlas adecuadas para su vuelta al río (es un proceso de descontaminación). Las operaciones llevadas a cabo en las EDAR se conocen como tratamientos primarios y secundarios en el mundo de la depuración. Sirven para separar grasas, sólidos, y materia orgánica fundamentalmente. Tras el tratamiento las aguas siguen estando cargadas de microorganismos que, al verterlas al cauce de un río, se diluyen hasta concentraciones inapreciables.

Las aguas regeneradas se emplean para el riego de parques y jardines y para el baldeo de calles fundamentalmente. Proviene de las aguas depuradas a las que se les aplica otro tratamiento, un tratamiento terciario. Se aplican en las instalaciones de las ERAR, que suelen contar con módulos adicionales a las depuradoras convencionales o EDAR, por las que sólo pasa un pequeño porcentaje del agua depurada. En este tratamiento terciario que se aplica al agua nos centramos en la desinfección (eliminar microorganismos). El nivel de desinfección a aplicar depende del uso que se le vaya a encomendar al agua, en el caso de los parques y jardines es bastante exigente, aunque el tratamiento más exigente se emplea en el agua regenerada para riego de productos en agricultura.

El Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas (BOE 294 de 8/12/2007), contempla estos requisitos. La mayoría de los parámetros que se controlan en estas aguas son microbiológicos y las técnicas cromatográficas no son de aplicación. En la *Tabla 4* se muestran las técnicas de referencia que aparecen en el anexo I del RD 1620/2007, únicamente se recurre a la cromatografía para la determinación de Orgánicos en el apartado de Sustancias Peligrosas.

Tabla 4. Anexo I del RD 1620/2007. Parámetros microbiológicos y contaminantes a determinar en muestras de aguas regeneradas. ¹⁶

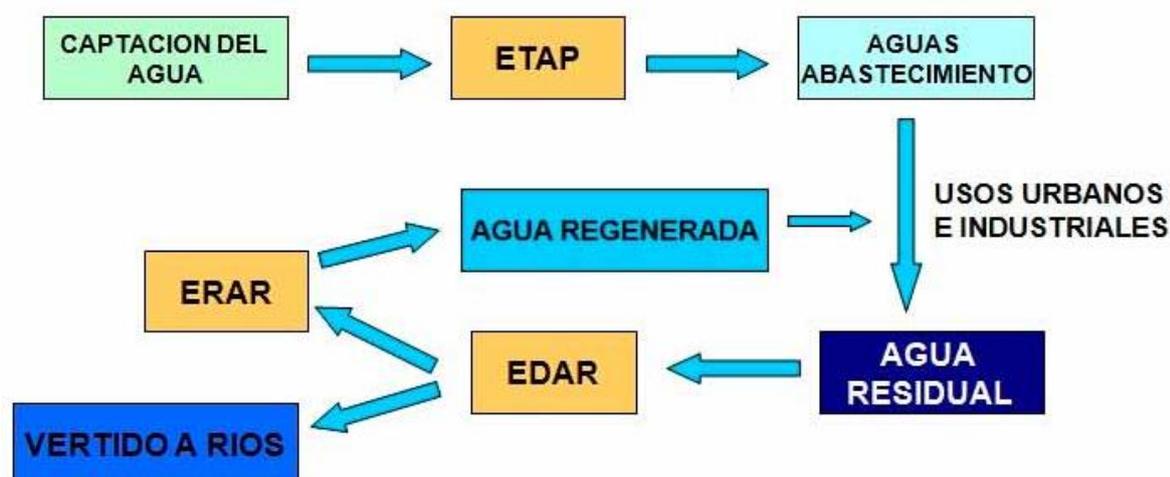
MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO	MÉTODOS O TÉCNICAS ANALÍTICAS DE REFERENCIA
Nematodos intestinales	Método Baillinger modificado por Bouhoum & Schwartzbrod. "Analysis of wastewater for use in agriculture" Ayres & Mara O.M.S. (1996)
<i>Escherichia coli</i>	Recuento de Bacterias <i>Escherichia Coli</i> - Glucuronidasa positiva
<i>Legionella spp</i>	Norma ISO 11731 parte 1: 1998 Calidad del Agua. Detección y enumeración de <i>Legionella</i> .
<i>Taenia saginata</i>	No específica
<i>Taenia solium</i>	No específica

CONTAMINANTES

PARÁMETRO	TÉCNICA DE REFERENCIA	U	LOQ
Sólidos en suspensión	Gravimetría con filtro de fibra de vidrio	30%	5 mg/L
Turbidez	Nefelometría	30%	0,5 UNT
Nitratos	Espectroscopía de absorción molecular Cromatografía iónica	30%	10 mg NO ₃ /L
Nitrógeno Total	Suma de Nitrógeno Kjeldahl, nitratos y nitritos Autoanalizador	30%	3 mg N/L
Fósforo Total	Espectroscopía de absorción molecular Espectrofotometría de plasma	30%	0,5 mg P/L
Sustancias Peligrosas	Cromatografía Espectroscopía	Metales: 30% Orgánicos: 50%	30% de NCA

En el siguiente esquema (*Figura 2*) se muestra resumido el ciclo integral del agua, mostrando el lugar que ocupa el agua regenerada en el ciclo mediante un diagrama de procesos.



<https://viagua.es/que-es-el-agua-regenerada/>

Figura 2. Esquema del ciclo integral del agua.

1.2.3.- Aguas residuales

En Europa, y por consiguiente en España, la depuración de las aguas residuales urbanas es una práctica obligada. Esto se hizo efectivo a partir de la publicación de la Directiva 91/271/CE de 21 de mayo de 1991, donde se define como principal objetivo proteger al medio ambiente de los efectos negativos de los vertidos de las aguas residuales urbanas y de los sectores industriales. Para poder cumplir este objetivo, se han construido y puesto en marcha multitud de instalaciones, que garantizan la recogida y el tratamiento de las aguas, en función del tamaño de la aglomeración y características de la zona de vertido.

En la Comunidad de Madrid, para el control de vertidos se aplica el DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento. En este documento legal se establecen los contaminantes peligrosos que pueden contener las aguas residuales, los valores paramétricos (*Tabla 5*) y las técnicas analíticas de referencia (*Tabla 6*) que han de emplearse para el análisis de estas aguas, en función del parámetro que quiera determinarse. En este decreto se definen también los denominados “vertidos prohibidos” al SIS, que son básicamente compuestos en cualquier estado de agregación que:

- Den lugar a mezclas explosivas, pudiendo provocar igniciones o explosiones por sí mismos o en presencia de alguna otra sustancia.
- Formen residuos sólidos o viscosos, pudiendo provocar obstrucciones en el SIS.
- Sean materiales colorantes, coloreando las aguas y que no puedan ser eliminados por los procesos habituales llevados a cabo en las EDAR.
- Constituyan residuos corrosivos, y puedan dar lugar a fenómenos de corrosión a lo largo de las instalaciones del SIS.
- Residuos que produzcan gases nocivos, pudiendo generarse en las atmósferas de alcantarillas, colectores y/o emisarios, en concentraciones tales que puedan suponer un riesgo para la salud o el medio ambiente. ¹⁷

Tabla 5. Anexo 2 del DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento.¹⁷

VALORES MÁXIMOS INSTANTÁNEOS DE LOS PARÁMETROS DE CONTAMINACIÓN

PARÁMETRO	Unidades	Valores máximos instantáneos
Temperatura	°C	40
pH (intervalo permisible)	unid. de pH	6 – 10
DBO ₅	mg/l	1000
DQO	mg/l	1750
Sólidos en suspensión	mg/l	1000
Aceites y grasas	mg/l	100
Cianuros totales	mg/l	5
Cloruros	mg/l	2000
Conductividad	µS/cm ²	7500
Detergentes totales	mg/l	30
Fluoruros	mg/l	15
Sulfatos	mg/l	1000
Sulfuros	mg/l	5
Toxicidad	Equitox/m ³	25
COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS Y SUSTANCIAS QUE LOS PUEDAN ORIGINAR EN AGUA		
Organohalogenados adsorbibles (AOX)	mg Cl/l	5
Trihalometanos, Total	mg/l	2,5
HIDROCARBUROS PERSISTENTES Y SUSTANCIAS ORGÁNICAS TÓXICAS BIOACUMULABLES		
BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, xileno)	mg/l	1,5
Fenoles totales	mg/l	2
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)	mg/l	1
Hidrocarburos totales	mg/l	20
METALES Y SUS COMPUESTOS		
Aluminio	mg/l	20
Arsénico	mg/l	1
Bario	mg/l	20
Boro	mg/l	3
Cadmio	mg/l	0,5
Cobre	mg/l	3
Cromo hexavalente	mg/l	1
Cromo total	mg/l	3
Estaño	mg/l	2
Hierro	mg/l	10
Manganeso	mg/l	2
Mercurio	mg/l	0,1
Níquel	mg/l	5
Plata	mg/l	1
Plomo	mg/l	1
Selenio	mg/l	1
Zinc	mg/l	3
Tóxicos metálicos		5
SUSTANCIAS QUE CONTRIBUYEN A LA EUTROFIZACIÓN		
Fósforo total	mg P/l	40
Nitrógeno total	mg N/l	125

Este mismo documento, en su anexo 4, incluye una tabla con las técnicas analíticas de referencia. En ella se incluyen requisitos de límite de detección, exactitud y precisión para cada parámetro (*Tabla 6*). En este apartado solo se incluirán los parámetros que hacen referencia a determinaciones cromatográficas, siendo la tabla presentada una simplificación de la existente en el anexo 4 del Decreto 57/2005.

Tabla 6. Anexo 4 del DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento.¹⁷

MÉTODOS ANALÍTICOS ESTABLECIDOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS VERTIDOS

PARÁMETRO	TÉCNICA	Límite de detección (%)	Precisión (%)	Exactitud (%)
Cloruros	Cromatografía iónica	10	10	10
Fluoruros	Cromatografía iónica	10	10	10
Trihalometanos (total)	Cromatografía de gases	10	20	20
BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno)	- Cromatografía de gases con detector cromatográfico específico o detector de espectrometría de masas. - Sistema de inyección específico para sustancias volátiles.	10	25	25
Fenoles totales	Cromatografía de gases	10	10	10
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)	- Cromatografía de líquidos de alta resolución. - Cromatografía de gases.	10	20	20

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL TRABAJO

El objeto principal de este trabajo fin de máster es situar a las técnicas cromatográficas dentro del plano general de técnicas instrumentales de las que dispone el laboratorio de análisis de aguas. Para ello, se elabora una introducción donde se aportan datos sobre la matriz: aguas naturales, destinadas al consumo y residuales; así como de aquellas especies químicas que pudiendo estar presentes en el agua, puedan determinarse mediante el empleo de la cromatografía.

Pese a que el tema central de este trabajo es el análisis cromatográfico de muestras de agua, no se pueden pasar por alto etapas previas al análisis como son el muestreo y la conservación de la muestra. Estos temas se tratarán de manera muy general pero siempre bajo un enfoque de subsecuente análisis cromatográfico.

El uso de la cromatografía está muy extendido entre los laboratorios que realizan análisis químico, y el laboratorio de análisis de aguas no es una excepción. Desde que fue descubierta por Mijaíl Tsvet en 1906, la cromatografía ha experimentado un aumento paulatino en lo que a su aplicabilidad se refiere, aunque el verdadero auge de la técnica surgió a partir de la década de 1980. Por este motivo, y con el objetivo de conocer el estado del arte de la técnica, se seleccionan artículos de investigación recientes (de antigüedad no superior a 10 años, aunque la mayoría no supera los cuatro años) que engloban diferentes modalidades de cromatografía, variedad de matrices y de analitos. Asimismo, se revisan investigaciones recientes relacionadas con los métodos de extracción que se utilizan en cromatografía aplicada al análisis de aguas, por ser una parte inherente al propio análisis cromatográfico.

Este documento pretende dar soporte a quien esté interesado en conocer la situación actual de la cromatografía en los laboratorios de análisis de aguas, así como servir de antecedente en investigaciones futuras, simplificando y centrando la tarea de búsqueda bibliográfica por parte del investigador.

3. PARTE TEÓRICA

3.1. EL MUESTREO EN AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EMPLEANDO LA CROMATOGRAFÍA

Existe un viejo axioma que dice que el resultado analítico aportado por cualquier método nunca puede ser mejor que la muestra sobre la que se ha realizado el análisis. Esto pone de manifiesto que la etapa del muestreo es crucial a la hora de considerar los resultados de los análisis. El objeto de este apartado es tratar todos los aspectos, especificaciones y procedimientos relacionados con la toma de muestra de aguas; para la subsecuente determinación de parámetros por técnicas cromatográficas.

El objeto del muestreo es obtener una porción de material lo suficientemente pequeña en volumen para ser transportada fácilmente, y a su vez lo suficientemente grande para poder realizar sobre ella las determinaciones analíticas pertinentes. Todo ello manteniendo siempre el requisito de la representatividad, la muestra ha de ser lo más parecida posible a la población sobre la que se ha realizado el muestreo, y el manejo de la muestra ha de garantizar que las concentraciones de los componentes se mantengan lo más estables posible entre la toma de muestra y el análisis.

3.1.1.- Requisitos generales del muestreo ¹⁸

La muestra obtenida durante el muestreo ha de ajustarse a los requerimientos del plan de muestreo que se haya realizado, debe ser manejada de tal forma que no se produzca un deterioro de la misma y se debe garantizar que no se produzcan contaminaciones previas al análisis. Los recipientes de toma de muestra, así como cualquier otro equipamiento auxiliar que se vaya a emplear en el proceso de toma de muestra, debe estar limpio y libre de cualquier contaminante.

Se deben evitar prácticas como el enjuagado del recipiente con la propia muestra, ya que no son nada beneficiosas. En el caso de existir un conservante, este puede perderse en el proceso de enjuagado. Además, si el analito tiene tendencia a adherirse a las paredes del recipiente, puede producirse un sesgo en el resultado.

3.1.2.- Requisitos particulares del muestreo ¹⁸

Según el parámetro que se vaya a determinar, la muestra de agua obtenida debe cumplir una serie de requisitos. En este apartado se mencionarán aquellos que son de aplicación a las muestras objeto de este estudio.

3.1.2.1.- Llenado del frasco: El volumen de llenado es un parámetro clave a considerar a la hora de tomar la muestra. En general, se debe dejar al menos un volumen de aire correspondiente al 1% de la capacidad del recipiente, para permitir la expansión térmica de la muestra durante el transporte. Sin embargo, algunas determinaciones requieren de muestras que se hayan tomado rellenando completamente el volumen del recipiente, sin permitir que se forme ninguna burbuja de aire. Es el caso de muestras sobre las que vayan a determinarse compuestos orgánicos volátiles, ya que estos migrarían preferentemente a la fase gaseosa durante el transporte.

3.1.2.2.- Empleo de muestras compuestas: La composición de muestras puede hacerse de diferentes formas (temporal, a diferente profundidad, en puntos de muestreo diferentes...). Esto minimiza el número de análisis a realizar, aportando una información menos pormenorizada de la población estudiada. Debido a la inestabilidad inherente de ciertas propiedades y/o compuestos, el empleo de muestras compuestas está desaconsejado para análisis cuantitativos en casos como: acidez, alcalinidad, cromo hexavalente, nitritos, COVs y temperatura. Sin embargo, otros parámetros como sulfatos, cianuros o índice de fenol se determinan de forma rutinaria mediante muestras compuestas.

3.1.2.3.- Filtrado de las muestras: En el caso de que las muestras requieran ser filtradas, siempre que sea posible es preferible realizar el filtrado en el momento de la recolección. Si esto no es posible, debido a riesgos de contaminación durante la manipulación, el filtrado ha de hacerse en cualquier caso previo a la conservación ácida de las muestras, si es que estas requieren acidificación. Las muestras para análisis cromatográficos siempre han de estar limpias de material particulado, una posterior filtración en el laboratorio es muy habitual.

3.2. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUAS PARA ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS ^{19, 20}

3.2.1.- Consideraciones generales relativas a la conservación de las muestras

La conservación de las muestras supone otra etapa fundamental en el proceso analítico. Una conservación inadecuada, bien sea por las condiciones de conservación (temperatura, luminosidad, pH...), bien por el tipo de recipiente empleado o bien por los periodos de almacenamiento; puede dar lugar a alteraciones en la composición de las muestras. El anexo A de la norma *ISO 5667-3:2012 Técnicas para la conservación de las muestras* incluye la *Tabla A1–Técnicas para la conservación de muestras. Análisis químicos y físico-químicos* donde se establecen las condiciones que se han de seguir para la conservación de las muestras de agua en función del parámetro a determinar.

Todos los reactivos que se empleen para la conservación de las muestras deben ser, al menos, de calidad analítica. En caso de emplear agua, esta debe cumplir al menos los requerimientos de calidad de grado 2, que se establecen en la Norma ISO 3696. Cualquier reactivo que se utilice debe etiquetarse indicando su periodo de validez, que informa sobre el periodo de tiempo en el que el reactivo se encuentra en condiciones adecuadas para su uso, siempre y cuando haya estado correctamente conservado.

La elección del recipiente que contendrá la muestra es muy importante, debe prestarse especial atención al material constitutivo de las paredes internas, así como el de los tapones. Estos envases han de estar fabricados con un material apropiado que sea capaz de garantizar que se conserven las propiedades de la muestra y el espectro de contaminantes previsto. Siempre que sea posible y económicamente viable, se debe optar por recipientes desechables.

3.2.2.- El transporte de las muestras

El transporte de las muestras también es una etapa que debe controlarse dentro del proceso analítico. Deben considerarse como variables a controlar el tiempo transcurrido entre el muestreo y el inicio del transporte y la duración del propio transporte. En ocasiones, es preciso recurrir a la refrigeración de las muestras en estas etapas con el fin de poder incrementar el tiempo disponible entre el muestreo y la recepción en el laboratorio. Una temperatura de refrigeración durante el transporte de $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ha demostrado ser adecuada para la mayoría de los análisis. La evaluación de estas condiciones de refrigeración puede llevarse a cabo

empleando un dispositivo de control de temperatura máxima y mínima, situado en el mismo embalaje que contenga las muestras.

3.2.3.- La identificación de las muestras

El sistema de etiquetado de las muestras debe resistir el agua, el frío y permitir su uso en el terreno de toma de muestra. En todo momento, la información suministrada en el etiquetado debe ser legible y contener al menos la siguiente información:

- Identificación inequívoca de la muestra (p. ej: número de muestra).
- Fecha, hora y lugar de muestreo.
- Descripción de la muestra.
- Cualquier información relativa a la integridad y manipulación de la muestra.

3.2.4.- La recepción de las muestras en el laboratorio

El personal del laboratorio debe verificar la información relacionada con la conservación de las muestras a su llegada. Se deben contrastar el número de envases recibidos frente a lo especificado en el plan de muestreo. Este proceso cobra especial importancia cuando existe una cadena de custodia. La cadena de custodia implica una responsabilidad especial sobre la muestra, donde para garantizar su integridad, todas las etapas en las que esté involucrada la muestra deben estar documentadas.

3.2.5.- Almacenamiento de las muestras en el laboratorio

La duración del almacenamiento de las muestras en el laboratorio viene determinada en gran medida por el analito que vaya a determinarse. Las condiciones de refrigeración de las muestras en el laboratorio deben estar comprendidas entre (3 ± 2) °C. Ciertos analitos, además, requieren oscuridad.

3.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EMPLEADOS EN CROMATOGRAFÍA

La mayoría de las muestras de agua que se analizan por técnicas instrumentales de separación son demasiado complejas (especialmente las aguas residuales), están demasiado diluidas (aguas destinadas al consumo) o son incompatibles con el sistema cromatográfico, lo cual impide su introducción directa. Estas situaciones requieren por tanto un tratamiento previo de la muestra, antes de realizar el análisis.

El tratamiento de muestras demasiado complejas, que habitualmente además son incompatibles con el sistema cromatográfico, tiene como principal objetivo la eliminación de componentes interferentes. Las interferencias que pueden acompañar a los analitos en las muestras pueden provocar dos efectos diferentes:

- Aumento de la señal analítica: con lo que se atribuye una mayor concentración de analito de la que existe en realidad (puede dar lugar a la aparición de falsos positivos).
- Inhibición de la señal: se determinan concentraciones inferiores a la real (pueden producirse falsos negativos).

En muestras muy diluidas, donde los contaminantes están en concentraciones inferiores a las que el método es capaz de determinar, el objeto del tratamiento de muestra es preconcentrar a los analitos de interés. Tradicionalmente los métodos de preparación en estos casos eran lentos y laboriosos, empleaban excesivos volúmenes de disolvente, daban lugar a rendimientos bajos y en general eran procesos poco selectivos. Los métodos automatizados han hecho posible que estos procesos sean más reproducibles al introducir menos fuentes de error, alivian el trabajo y la dedicación del analista y son más limpios y económicos a medio y largo plazo.

Seguidamente se detallan los métodos de tratamiento de muestra empleados de forma rutinaria en cromatografía en el laboratorio de análisis de aguas.

3.3.1.- La extracción sólido-líquido (SPE) ^{21, 22, 23}

La extracción sólido-líquido se basa en la adsorción de compuestos orgánicos de la matriz por una fase sólida inmovilizada sobre algún soporte. Una vez alcanzado el equilibrio, los compuestos que han sido adsorbidos se desorben para ser introducidos directamente en el

sistema cromatográfico. En cromatografía de gases, suele emplearse una desorción térmica que conduce al analito directamente al inyector de un cromatógrafo. Alternativamente, en cromatografía líquida, se puede disolver el extracto en un disolvente orgánico apropiado para analizarlo posteriormente por HPLC. Siempre que sea posible, se recurre a la propia fase móvil o a alguno de los disolventes que la componen para extraer los analitos adsorbidos durante la extracción.

La extracción sólido-líquido, seguida de análisis cromatográfico es adecuada para la determinación de sustancias tales como pesticidas, compuestos fenólicos, estrógenos y antibióticos entre otros. Según el analito a determinar, la composición óptima de la fase sólida extractante puede variar; es conveniente hacer una selección adecuada entre las que se dispongan con el fin de maximizar la eficacia del proceso. Se suele evaluar la idoneidad de la fase sólida a partir del MLOQ y de un estudio de recuperaciones. Los adsorbentes utilizados suelen comercializarse en forma de cartuchos, se dividen en dos grandes grupos: los de base polimérica y los de base de sílice.

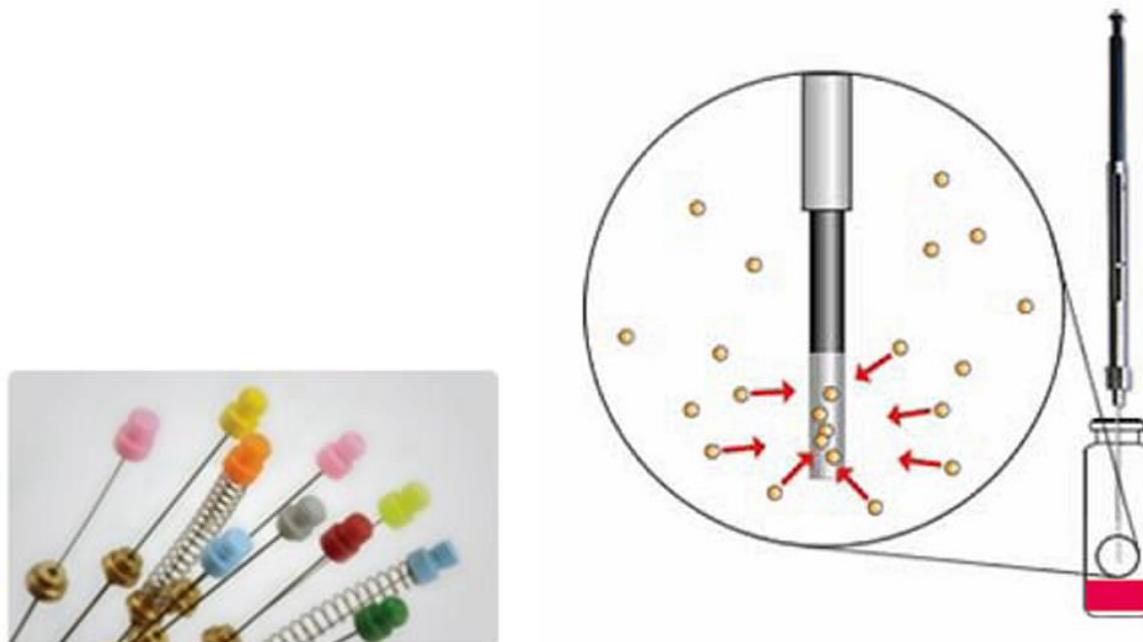
3.3.2.- La microextracción en fase sólida (SPME) ^{24, 25}

Es una técnica de preparación de muestra que no requiere el empleo de disolventes. Esta técnica permite incorporar el proceso de tratamiento de la muestra en modalidad on-line, facilitando así la labor del analista y minimizando errores. Los compuestos extraídos pueden ser analizados empleando tanto cromatografía líquida como cromatografía de gases. Algunos estudios (Bourdat-Deschamps et al.)²⁴ han logrado incorporar este proceso de extracción a sistemas de UPLC en tándem con detectores de espectrometría de masas, minimizando así el efecto matriz que presentan las muestras en la determinación de compuestos farmacéuticos. El principal desafío que se logra en la extracción es minimizar los efectos de matriz observados en la espectrometría de masas, principalmente debido a la supresión iónica. Dependiendo del contenido en COD y de su origen, los valores oscilan entre -22% y +20% y entre -38% y -93% de la señal obtenida sin la matriz, en agua de suelo y en lixiviados de lodos, respectivamente. Los niveles tan variables de efecto matriz sugieren establecer límites de contenido en COD por encima de los cuales se requiera que la muestra sea purificada. Estos valores de corte dependen de los compuestos, con concentraciones de carbono en agua que varían de 30 a 290 mg/L para antibióticos hasta 600-6400 mg/L para los compuestos más apolares. En el mencionado estudio se optimizó un procedimiento de extracción modificado, rápido, fácil, barato, efectivo, resistente y seguro utilizando una metodología de diseño experimental, con el fin de purificar muestras con altos contenidos de

COD. A partir de esta aplicación de la SPME se ha permitido el análisis de fluoroquinolonas y tetraciclina.

Los dispositivos empleados en la SPME suelen comercializarse en forma de pequeñas fibras (Figura 3) cubiertas con una fase que realiza la extracción, puede estar constituida de un polímero líquido o un adsorbente sólido.

http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/claves_quimicas_aroma_cienc1010.htm



[http://www.selectscience.net/products/polydimethylsiloxane+divinylbenzene-\(pdms+dvb\)-spme-fibers/?prodID=195985](http://www.selectscience.net/products/polydimethylsiloxane+divinylbenzene-(pdms+dvb)-spme-fibers/?prodID=195985)

Figura 3. Fibras empleadas en la SPME (fotografía y esquema).

Existen otros compuestos como las microcistinas²⁶ que pueden determinarse también utilizando procesos de SPME. En este caso concreto, se ha demostrado que la obtención de muestras desaladas es crítica para garantizar la robustez del método. La elección de la fase extractante adecuada se realiza mediante diseños experimentales. Los volúmenes de muestra necesarios para los análisis suelen estar comprendidos entre 1 y 10 mL. Los análisis de aguas para la determinación de microcistinas empleando SPME seguida de análisis por UPLC con electronebulización y detección de masas (triple cuadrupolo) tienen una duración media de 8 minutos, llegando a valores de LOQ de 0,5 ng/L.

Otra de las ventajas que ofrece este sistema de tratamiento de muestra es la posibilidad de realizar reacciones de derivatización in situ. Baños et al.²⁷ compararon seis extractantes clásicos de SPE (sílice RP-C18, LiChrolut EN, fullereno Amberlite XAD-2, C₆₀, nanotubos de

carbono multipared y carbono grafitado negro) para estudiar procesos de derivatización y preconcentración de aldehídos, para su posterior análisis cromatográfico. La reacción de derivatización se emplea con frecuencia en análisis químico y consiste en transformar un compuesto químico en un producto que posee una estructura química similar. En general, en la reacción se aprovecha un grupo funcional específico del compuesto original para transformarlo en un derivado que posea una reactividad química, solubilidad, punto de ebullición, punto de fusión, estado de agregación o polaridad diferentes a las originales. Estas nuevas propiedades químicas se utilizan para la cuantificación o separación del compuesto de partida. Una aplicación característica de estas reacciones tiene lugar en la determinación de ácidos grasos en muestras de aceite empleando GC. Los ácidos grasos, dada su estructura y polaridad, poseen puntos de ebullición demasiado elevados para ser analizados por GC, por lo que se recurre a su transformación en ésteres metílicos mediante una reacción de esterificación de Fischer. Los ésteres, al ser más volátiles que los compuestos de partida, pueden ser introducidos con facilidad en un sistema GC. De este modo, cada éster se relaciona inequívocamente con el ácido graso de partida ^{28, 29}.

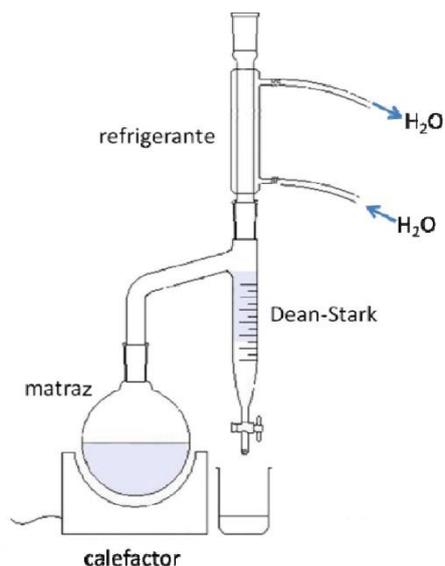
3.3.3.- La extracción líquido-líquido (LLE) ²⁹

La LLE es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. Su mecanismo de acción está basado en la diferencia de solubilidad del analito en dos disolventes diferentes. Al agitar un compuesto con dos disolventes inmiscibles (en un embudo de extracción, por ejemplo), el compuesto se distribuye entre los dos disolventes. Dada una temperatura concreta, la relación de concentraciones del compuesto que existe en cada disolvente es constante, esta constante se denomina coeficiente de distribución o de reparto (Ecuación 1).

$$K_{distribución} = \frac{Conc.\text{disolv.2}}{Conc.\text{disolv.1}}$$

Ecuación 1. Expresión de la constante de distribución o reparto.

La operación de extracción líquido-líquido puede realizarse en continuo, es decir, el proceso se lleva a cabo en un sistema cerrado donde el disolvente de extracción se reutiliza continuamente. Para ello, se emplea un dispositivo que consta de un matraz al que se le aplica calefacción y un refrigerante donde condensan los vapores del disolvente, y que a su vez contiene la disolución acuosa a extraer. Al finalizar el proceso, la mayoría del compuesto a extraer se encuentra en el matraz que alberga al disolvente, producto de extracciones sucesivas con arrastre del analito hacia el matraz por condensación. En la *Figura 4* se muestra de forma esquematizada un dispositivo empleado para realizar una LLE en continuo.



http://www.ub.edu/talq/sites/default/files/12-12_cas.jpg

Figura 4. Dispositivo de LLE (Dean-Stark).

3.3.4.- Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) ³⁰

La microextracción líquido-líquido dispersiva, es una novedosa técnica de extracción que consiste en una miniaturización de la extracción líquido-líquido, que fue presentada por primera vez en el año 2006. El proceso consta de un sistema ternario de disolventes:

- Muestra acuosa: contiene el/los analito(s) de interés.
- Extractante: disolvente orgánico inmisible con la matriz donde el analito es más soluble que en fase acuosa.
- Dispersante: disolvente orgánico que es miscible con ambas fases (acuosa y extractante) y que sirve como puente entre ambas.

El procedimiento para realizar una microextracción es sencillo y consta de las siguientes etapas:

- 1) Mezclado de los disolventes extractante y dispersante.
- 2) Inyección rápida con jeringa de la mezcla extractante en el seno de la muestra acuosa.
- 3) Homogeneización de la mezcla (sistema ternario) y formación de la emulsión.
- 4) Centrifugación para la separación de las fases.

La elección de un disolvente adecuado es un parámetro esencial al considerar la eficacia de la DLLME. El disolvente extractante ha de ser insoluble en agua, tener una elevada afinidad por los analitos, poseer buen comportamiento cromatográfico y ser fácilmente dispersado en la fase acuosa. Habitualmente se utilizan disolventes clorados (diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono), así como otros disolventes no halogenados (isohexano o isobutanol). Por otro lado, la característica principal que debe tener un buen dispersante es ser soluble tanto en fase acuosa como en la extractante. Los dispersantes más usados son: acetona, acetonitrilo, dimetilformamida, metanol y otros alcoholes de cadena media (propanol o butanol).

3.3.5.- La extracción con fluidos supercríticos (SFE) ^{31, 32}

Un fluido supercrítico se logra a partir de cualquier sustancia que se somete a una presión y temperatura superiores a las de su punto crítico termodinámico. Posee propiedades destacables como la de difundirse a través de los sólidos como si se tratase de un gas, y la de disolver materiales como lo hace un líquido. La SFE es una técnica de separación de sustancias incluidas dentro de una matriz, que se basa fundamentalmente en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico de modificar su poder disolvente. Las principales ventajas que presenta la extracción con SCF son: rápida y eficaz extracción, posibilidad de elección de disolventes como H₂O y CO₂, que no son contaminantes y cuyo exceso es fácil de eliminar. Un fluido supercrítico puede separarse del analito disuelto que contenga simplemente disminuyendo la presión. La recuperación del analito es sencilla, ya que los SCF son gases en condiciones ambientales. El sistema SFE puede actuar de dos modos:

- 1.- Extracción dinámica: el fluido supercrítico fresco llega de manera continua a la muestra y el analito fluye continuamente hacia el recipiente, donde tiene lugar la despresurización (eliminación del fluido supercrítico).
- 2.- Extracción estática: la válvula situada entre la cubeta de extracción y el restrictor está cerrada. La cubeta de extracción se encuentra presurizada en condiciones estáticas.

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una modalidad de cromatografía en fase normal que se utiliza para el análisis de sustancias de bajo a moderado peso molecular. Los principios son similares a los del HPLC, sin embargo, la SFC típicamente utiliza CO₂ como fase móvil. Entre sus principales ventajas destacan:

- Eliminar la necesidad de utilizar LC en fase normal.
- Difusividades de los solutos de un orden de magnitud superior en comparación con las que tienen en los líquidos; las viscosidades de la fase móvil son un orden de magnitud inferior que las de los disolventes líquidos.
- Suponen un sistema para separaciones hidrofílicas e hidrofóbicas en la misma disolución.

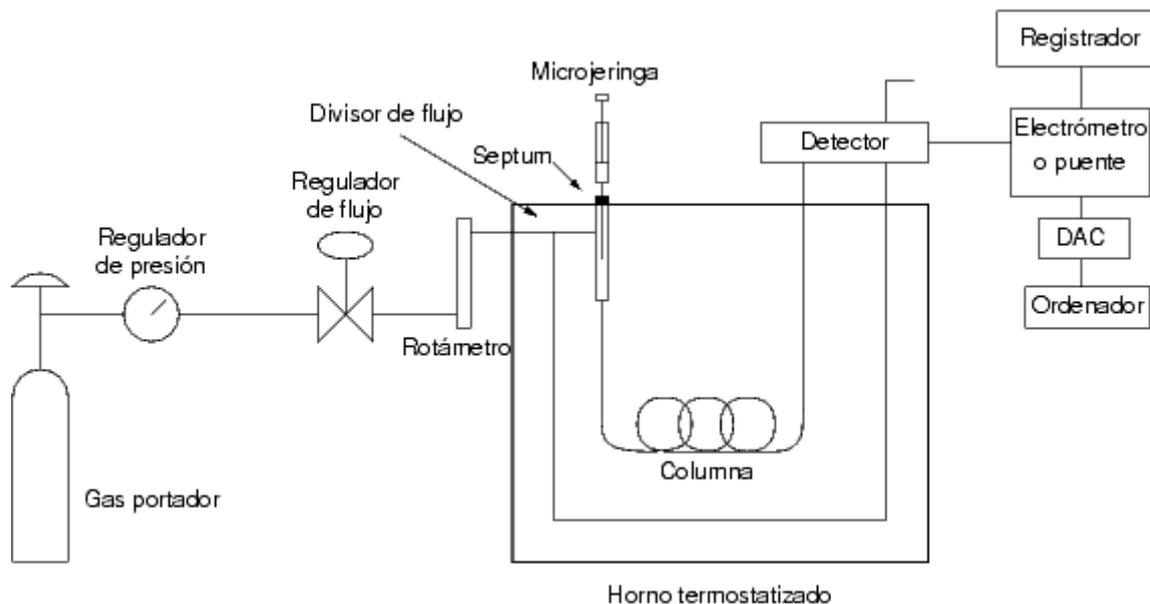
3.4. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS EN LOS LABORATORIOS DE ANÁLISIS DE AGUAS

La cromatografía es una herramienta muy potente empleada en el análisis de muestras de muy diversa naturaleza. Su principio básico de funcionamiento se basa en la retención diferencial de analitos por la fase estacionaria, mientras estos son transportados por una fase móvil a lo largo de la columna cromatográfica (o cualquier otro soporte en caso de no ser cromatografía en columna). Una clasificación muy habitual de las técnicas cromatográficas se puede establecer atendiendo a la naturaleza de la fase móvil: cromatografía líquida y cromatografía de gases. Existen otras modalidades de cromatografía, como la cromatografía de fluidos supercríticos mencionada en el apartado anterior, que pueden formar otros subgrupos dentro de esta clasificación. En este estudio, se va a profundizar en los análisis cromatográficos de muestras de aguas, estableciendo una clasificación en función del tipo de cromatografía empleada.

3.4.1.- Cromatografía de gases (GC) ³³

En cromatografía de gases, una fina película de fase estacionaria se encuentra confinada en la columna. De manera continua durante el análisis, la fase estacionaria está en contacto con una corriente de fase móvil que recorre el interior de la columna (gas portador). Existen dos clases de columnas cromatográficas que se emplean en GC: empaquetadas o de relleno y tubulares abiertas (capilares). En cuanto a la modalidad de cromatografía de gases, se tienen dos tipos: cromatografía gas-sólido y cromatografía gas-líquido. Esta división hace alusión al estado de agregación de la fase estacionaria (sólido o líquido), el uso de la cromatografía gas-líquido está mucho más extendido en los laboratorios.

En la *Figura 5* se muestra un diagrama de un cromatógrafo de gases. En él aparecen los componentes básicos que forman estos equipos. La columna en cromatografía de gases habitualmente está termostaticada, dando lugar a dos tipos de análisis: isoterma (temperatura constante en todo el proceso) o en gradiente (programas de temperaturas a lo largo del análisis). Los dos requisitos fundamentales que han de cumplir los analitos determinados mediante GC es ser volátiles y térmicamente estables.



https://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_de_gases#/media/File:Cromatografo_de_gases_diagrama.png

Figura 5. Diagrama de las partes que componen un cromatógrafo de gases.

En la mayoría de los análisis se utiliza GC con empleo de columnas apolares (5% fenil 95% dimetilarileno siloxano). También destaca el uso de columnas apolares de 95% dimetil 5% difenil polisiloxano. Las dimensiones de las columnas más habituales son 30 m x 0,25 mm, con grosores de película de fase estacionaria de 0,25 μm .

3.4.2.- Cromatografía líquida (LC) ³⁴

La cromatografía líquida comprende diversas técnicas cromatográficas que tienen en común un elemento: la fase móvil. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación (ver *Figura 6*), al igual que lo es GC, y no debe confundirse con una técnica de análisis per se. La variante más empleada de cromatografía líquida es el *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), es un tipo de cromatografía líquida en columna donde la fase móvil se introduce en la columna mediante una bomba que suministra presión al eluyente. En análisis de aguas por cromatografía líquida, las dos variedades más empleadas y por tanto las que se contemplan en este estudio son HPLC y cromatografía iónica.

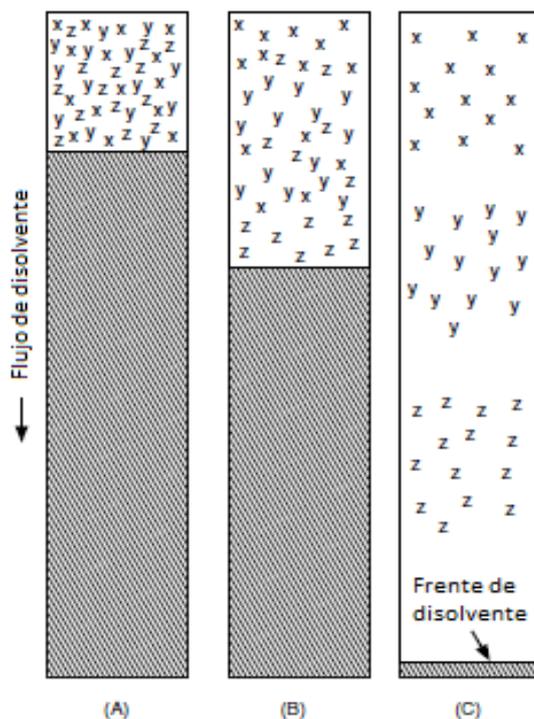


Figura 6. La separación de analitos durante el proceso cromatográfico. ³⁴

3.4.2.1.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Existen dos modalidades de HPLC: fase normal (emplea fase móvil apolar y fase estacionaria polar) y fase inversa (fase móvil polar y fase estacionaria apolar). La gran mayoría de los análisis cromatográficos de muestras de agua se realizan empleando HPLC en fase inversa, por la variedad de fases estacionarias disponibles, que confieren una elevada selectividad.

En relación con la cromatografía de gases, el HPLC presenta algunas ventajas que hacen que en muchas ocasiones se tenga en cuenta como la opción preferente, a saber:

- En HPLC tanto la fase móvil como la fase estacionaria participan activamente en la separación cromatográfica, mientras que en GC la fase móvil actúa únicamente como gas portador de los analitos. Por tanto, se posibilitan interacciones más selectivas con las moléculas de la muestra.
- En HPLC se utilizan temperaturas más suaves en el proceso de separación.
- La gran variedad de fases estacionarias disponibles en el mercado, con diferentes empaquetamientos, posibilitan un amplio rango de especificidad.

3.4.2.2.- Cromatografía iónica (IC) ³⁵

La cromatografía iónica es otra modalidad de cromatografía líquida que surgió en el año 1975 a partir de un intercambiador de iones y una detección conductimétrica de aniones y cationes. Presenta una serie de ventajas en el análisis de aguas de consumo y residuales frente a los métodos convencionales, como es la determinación simultánea de cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos y de amonio.

Aunque la separación mediante intercambiadores de iones es la modalidad mayoritaria en IC, existen otros métodos como la exclusión de iones (IEC), la cromatografía de emparejamiento de iones (IPC) y la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) que también pueden emplearse cuando se trabaja con IC. La *Figura 7* muestra las distintas fases estacionarias empleadas en cromatografía iónica.

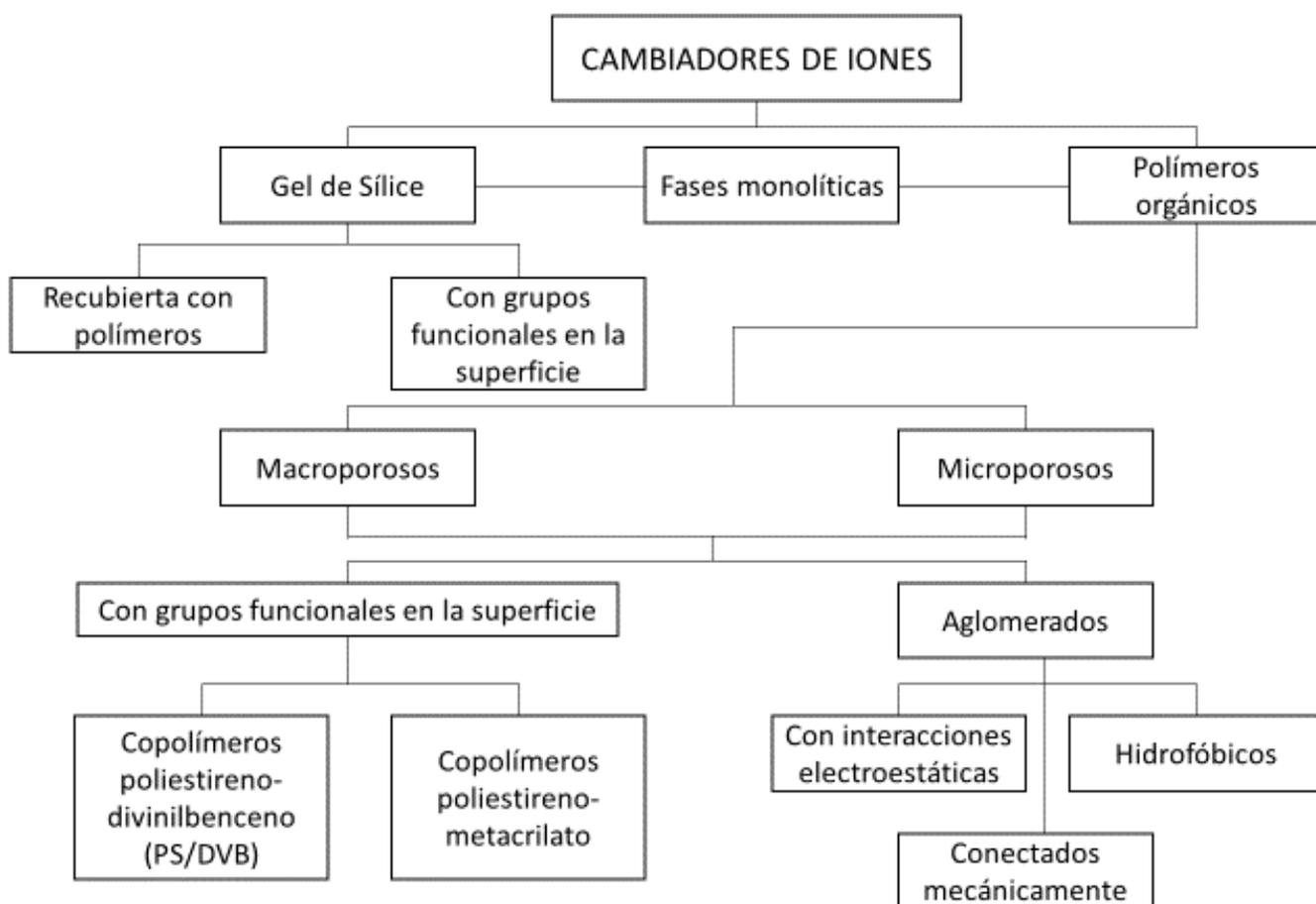


Figura 7. Fases estacionarias empleadas en IC. ³⁵

Entre la amplia variedad de fases estacionarias que pueden utilizarse en análisis de aguas, es frecuente encontrar polímeros orgánicos debido a su elevada estabilidad frente a variaciones bruscas de pH en comparación con aquellas basadas en materiales de sílice.

El eluyente empleado (fase móvil) también constituye otro factor importante a tener en cuenta de cara a la eficacia de la separación y a la selectividad. Es importante controlar aspectos como la composición, concentración, pH y flujo. Los eluyentes más habituales empleados en IC de intercambio de aniones son: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$, NaOH/KOH y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Los más típicos en IC de intercambio de cationes son disoluciones acuosas diluidas de: HNO_3 , HCl , ácido dipicolínico (ácido piridín-2,6-dicarboxílico o DPA), ácido tartárico y ácido oxálico. La selectividad del proceso de separación puede modificarse al variar la fase móvil y la fase estacionaria empleadas, siempre y cuando sean compatibles con el sistema de detección. El detector de conductividad es el más utilizado en separaciones de intercambio iónico, siendo válido para cualquier ion que presente un pK_a o pK_b inferior a 7. La *Figura 8* muestra una clasificación de los detectores empleados en IC. Por otra parte, la detección UV-VIS es la más habitual cuando la separación se lleva a cabo en una columna RPLC, pero su aplicación directa es limitada en IC debido a que pocos iones inorgánicos cuentan con grupos cromóforos. Para solventar esa situación, se desarrolló la detección UV-VIS con reacción post-columna, que permite una detección mucho más versátil al contar con una selectividad y una sensibilidad mejorada para aplicaciones específicas.

La cromatografía iónica es una técnica cromatográfica cada vez más utilizada en los laboratorios de análisis de aguas debido a las ventajas que presenta respecto a los clásicos métodos húmedos de análisis. Las más relevantes son:

- Tiempos cortos de análisis (10 – 15 min).
- Elevada selectividad y sensibilidad incluso en muestras complejas.
- Tratamiento de muestra sencillo (habitualmente basta con filtrar con un tamiz de $0,45 \mu\text{m}$ de poro).
- Posibilidad de separación y cuantificación simultánea de aniones y cationes.
- Empleo de reactivos baratos, seguros y ecológicos.

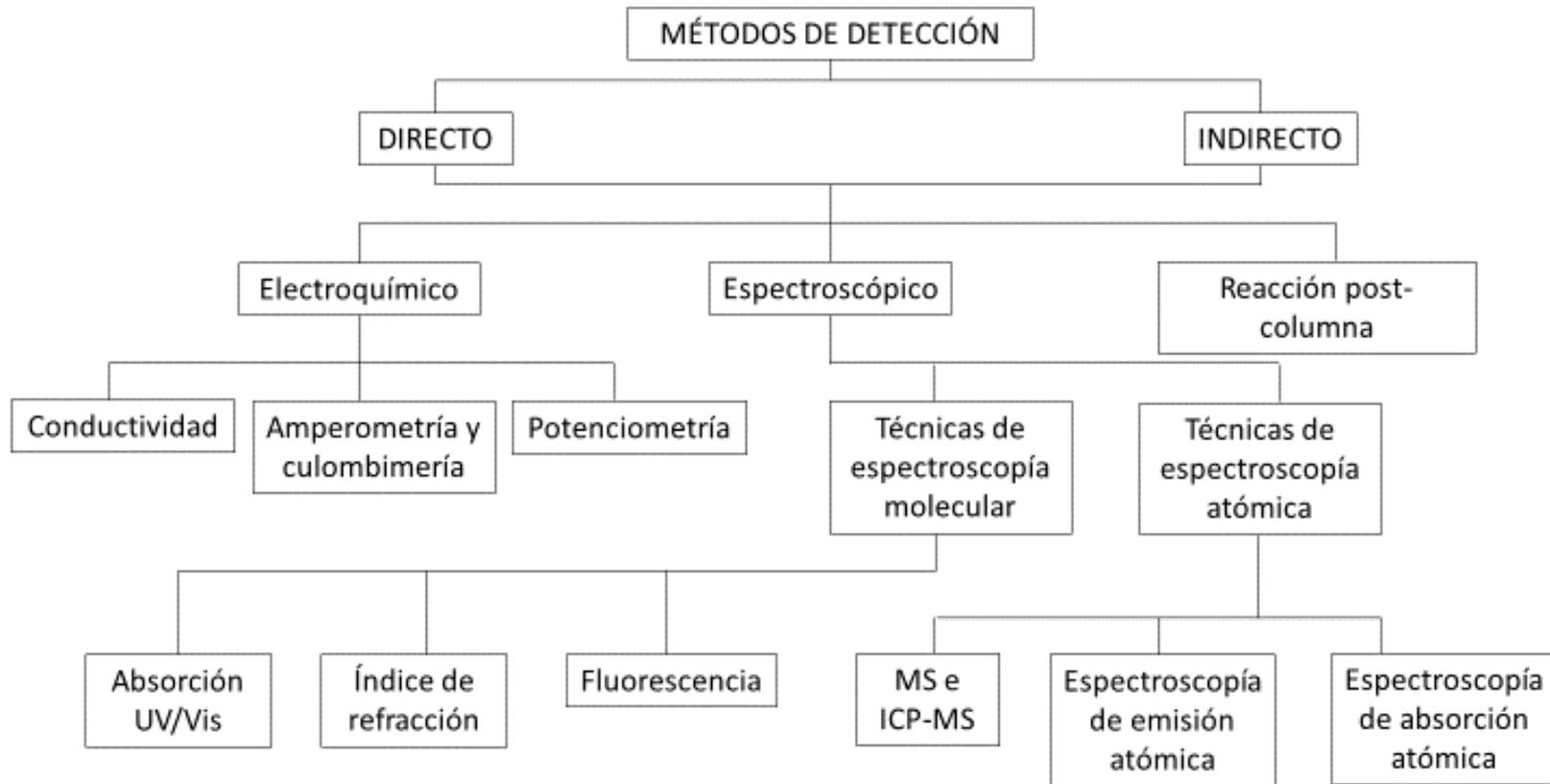


Figura 8. Clasificación de los métodos de detección utilizados en IC. ³⁵

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. TRABAJOS SELECCIONADOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

4.1.1.- Técnicas de extracción utilizadas en determinaciones de compuestos productores de olor

Callejón y colaboradores ³⁶, en una revisión del campo realizada en 2016, presentaron los avances más recientes en el análisis de compuestos productores de olor. Estos compuestos generalmente están relacionados con la actividad de microorganismos, y el olfato humano posee un umbral muy bajo para la detección de estos olores, del orden de ng/L o µg/L dependiendo de la matriz en la que la molécula está disuelta y del propio individuo que la detecta. Concentraciones tan bajas suponen un reto para el análisis químico, que debe ajustarse a las preocupaciones de la industria y del consumidor.

Los procesos de cloración del agua en ocasiones dan lugar a la formación de especies organocloradas como el 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA), por reacción del cloro activo con la materia orgánica presente en el agua durante el tratamiento de la misma o durante su transporte por la red de distribución. Otros productores de olor muy frecuentes como la Geosmina (GSM) o el 2-metilisoborneol (MIB) se producen como metabolitos secundarios de algunos microorganismos. En la *Tabla 7* se presentan las descripciones de olor y los umbrales sensoriales de algunos productores de olor habituales en agua. Pese a que los niveles de percepción de los haloanisoles varían en función de la persona y de la concentración en la muestra, los umbrales de detección están comprendidos entre 0,03 ng/L y 4 µg/L.

La GSM y el 2-MIB, junto con los haloanisoles, están considerados como los principales compuestos responsables del característico olor a “tierra mojada” que puede presentar en ocasiones el agua de consumo.

Tabla 7. Descripción del olor y valores umbrales de detección sensorial de compuestos productores de olor presentes en aguas.³⁶

Descripción del olor y valores sensoriales umbral para compuestos productores de olor.

Compuesto	Descripción del olor	Valor umbral
Haloanisoles		
2,4-Dicloroanisol	Rancio	0.4 µg/L
2,6-Dicloroanisol	Rancio	0.04 µg/L
2,3,4-Tricloroanisol	Rancio	0.2-2 ng/L
2,4,6-Tricloroanisol	Rancio	0.03-10 ng/L
2,3,6-Tricloroanisol	Rancio	0.1-2 ng/L
Tetracloroanisol	A moho/polvo	4 g/L
Pentacloroanisol	Rancio-a tierra	4 ng/L
Tribromoanisol	A moho; Rancio	8 pg/L
Halofenoles (precursores)		
2,4-Dichlorophenol	Fenólico	no disponible
2,6-Dichlorophenol	Fenólico	no disponible
2,4,6-Trichlorophenol	Fenólico	no disponible
Tetraclorofenol	Fenólico; Rancio	no disponible
Pentaclorofenol	Fenólico; Rancio	no disponible
Dibromofenol	Medicinal	0.5 ng/L
Otros compuestos productores de olor		
Geosmina	Alcanfor; Fangoso	4-10 ng/L
2-Metilisoborneol	A tierra; Fangoso	1-10 ng/L
1-Octen-3-ol	A setas	2ng/L
1-Octen-3-ona	A setas	3 ng/L

La cromatografía de gases acoplada a detección de masas es la técnica por excelencia para la determinación de estos compuestos, que requieren de técnicas con alta selectividad y sensibilidad que proporcionen identificaciones inequívocas. Debido a que se trabaja a niveles de traza, la preparación de la muestra juega un papel esencial en estos análisis, donde se requieren extracciones muy eficientes o preconcentraciones.

Los primeros análisis contaban con etapas de preparación de muestra que consistían en extracciones con disolvente o destilaciones con arrastre de vapor. Otras técnicas de tratamiento de muestra incluyen los llamados espacio de cabeza dinámicos (DHS), tales como la purga y trampa y la pre-evaporación. Recientemente se ha aplicado un método de purga y trampa empleando un dispositivo de extracción en forma de aguja para la determinación de productores de olor en agua de grifo. La SPE ha demostrado ser útil en la eliminación de interferencias originales de la matriz a la vez que concentran analitos provenientes de muestras de agua y otras. Recientemente, técnicas como la SPME, la extracción sobre barra de agitación (SBSE) o la microextracción líquido-líquido (LLME) han sido propuestas para la determinación de productores de olor en aguas. La *Tabla 8* incluye ejemplos de algunos estudios.

La SPME es sencilla de automatizar, requiere poco volumen de muestra y emplea tiempos de extracción que típicamente comprenden unos 30 minutos. Existen dos modalidades principalmente, con inmersión directa en la muestra (DI-SPME) o con extracción proveniente del HS, esta segunda opción es la más empleada. La optimización de métodos de HS-SPME requiere la evaluación de varios parámetros como el tipo de fibra, tiempo de extracción, temperatura, uso de sales para alterar la fuerza iónica y la selección del patrón interno (IS).

La SBSE tiene un principio de funcionamiento similar a la SPME, con la salvedad de que esta se produce sobre una barra magnética cubierta de una fase polimérica en constante agitación. El proceso de desorción puede llevarse a cabo tanto por desorción térmica (TD) en la entrada del cromatógrafo seguido de un crioenfoque, como por una desorción líquida (LD) con disolvente. Los tiempos de extracción rondan una hora en extracciones con SBSE, sin embargo, se tiene una mayor variedad de adsorbentes y por tanto una mejora de la sensibilidad frente a la SPME.

Tabla 8. Metodologías de microextracción para el análisis de compuestos productores de olor en agua.³⁶

Metodologías de microextracción de sorción reportadas para el análisis de compuestos productores de olor en el agua.

Metodología	Analitos	Tipo de fibra	Tiempo de extracción y temperatura	Adición de sal	Patrón interno	Detector (modo de ionización)	LOD (ng/L)
Microextracción en fase sólida (SPME)							
HS-SPME-GC-MS	2,4,6-TCA	DVB/CAR/PDMS	30 min/50 °C	30% (w/v) NaCl	3-Isobutil-2-	Trampa de iones	0.40–0.47
HS-SPME-GC-MS	IPMP; IBMP; 2-MIB; GSM;	DVB/CAR/PDMS	30 min/65 °C	1 g NaCl	No reportado	MS-SIM modo (EI)	0.1–73
HS-SPME-GC-MS	2,4,6-TCA IPMP; IBMP; 2-MIB; GSM;	DVB/CAR/PDMS	30 min/90 °C	6 g NaCl	Naftaleno- Deuterado	MS-SIM modo (EI)	0.25–0.61
HS-SPME-GC-MS	2,4,6-TCA; 2,3,4-TCA; 2,3,6-TCA IPMP; 2-MIB; GSM;	DVB/CAR/PDMS	30 min/65 °C	Saturado NaCl	IBMP	MS-SIM modo (EI)	0.2–0.5
HS-SPME-GC-MS	2,4,6-TCA IPMP; IBMP; 2-MIB; 2,4,6-TCA;	DVB/CAR/PDMS	30 min/70 °C	6 g NaCl	No reportado	MS-Scan modo (EI)	<1
HS-SPME-GC-ECD	2,3,6-TCA; GSM 2,4,6-TCA	PDMS	30 min/40 °C	Saturado Na ₂ SO ₄	No reportado	ECD	0.7
HS-SPME-GC-MS	GSM; 2-MIB	PDMS/DVB	40 min/70 °C	7 g NaCl	4-D	MS-modo Scan	0.42–0.81
Extracción sobre barra en agitación (SBSE)							
SBSE-GC-MS-MS	2,4,6-TCA; TeCA; TBA; 2,4,6-TCP; TeCP; TBP	PDMS	60/R.T.	No reportado	μ-Hexalactona	MS-MS (CI y EI)	0.03–0.7
D-SBSE-GC-MS	2,4-DCP; 2,4,6-TCP; TeCP; PCA	PDMS	60 min/R.T.	No reportado	Deuterado análogo	MS-SIM modo (EI)	1–2
SBSE-GC-MS	GSM; 2MIB	PDMS	120 min/R.T.	No reportado	No reportado	Full Scan	1–3

D, derivatización; *n.i.*, sin información; *R.T.*, temperatura ambiente.

4.1.2.- Técnicas de extracción utilizadas en determinaciones de contaminantes emergentes en matrices acuosas

En un reciente estudio de 2017 ³⁷ se han determinado cinco contaminantes emergentes en matrices acuosas: 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, metilparabeno, triclocarban y 3-(4-metilbencilideno) alcanfor. Para ello, se recurrió al empleo de técnicas de extracción basadas en DLLME. En un principio, se aplicó la DLLME normal, y posteriormente se hicieron pruebas introduciendo variaciones como: DLLME revertida o inversa, procedimientos que incluían la utilización de líquidos iónicos o extracciones asistidas por surfactantes (SA-DLLME). Estas técnicas pueden aplicarse tal cual o asistidas por vórtex o ultrasonidos.

La primera variable a optimizar fue el disolvente empleado para el relleno de los poros de la membrana, fijando las siguientes condiciones de ensayo: pH, tiempo de extracción, volumen de adición de extractante / dispersante y fuerza iónica (adición de sal). Se hicieron pruebas con tres disolventes para el relleno de poros de la membrana: 1-octanol, tolueno e isocianato, resultando ser el 1-octanol el que lograba mayor eficiencia en la extracción.

A continuación, se llevaron a cabo estudios de optimización del pH de la muestra, tiempo de extracción y efecto salino. Debido a una baja sensibilidad del detector de DAD para clorofenoles, el pH óptimo resultó ser 4.0. Por otra parte, el tiempo de extracción que proporcionó mejor resultado fue de 45 minutos. Debido a que la adición de sal a las muestras provoca que los analitos sean menos solubles en agua y por tanto migren con mayor facilidad a la fase orgánica extractante, se concluyó que una adición del 30% (m/v) de cloruro sódico daba lugar a las condiciones óptimas de extracción.

Por otro lado, una vez fijadas las condiciones de extracción, se hicieron pruebas para determinar la combinación agente extractante / dispersante más adecuada. Se probó con tolueno, hexano e isocianato como extractantes, resultando ser el primero el más adecuado. Como agente dispersante se seleccionó la acetona. La *Figura 9* muestra los resultados de estas pruebas (Condiciones MMLLE-DLLME: 20 mL de agua ultra pura dopada con 50 µg/L de cada analito, pH de las muestras de 4,0 unidades, 30% NaCl, 500 µL de extractante/dispersante (1:10), tiempo de extracción de 45 min, revestimiento de membrana con 1-octanol).

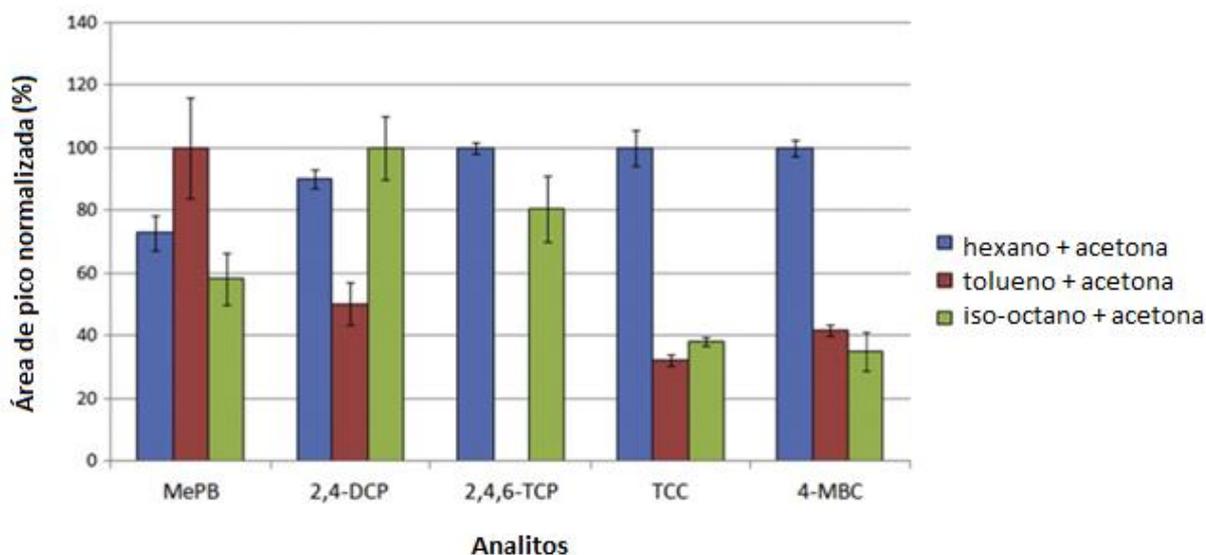


Figura 9. Efecto de la mezcla de disolventes de extracción/dispersión.³⁷

La influencia de la proporción de agente de extracción / agente dispersante también fue estudiada. Cuando la proporción de dispersante es baja (1:4), las microgotas de extracción no se forman de manera eficaz, por lo que el poder de extracción se ve mermado. Una proporción demasiado elevada (1:10) tampoco es adecuada, ya que facilita que los analitos sean más solubles en la muestra, lo que también disminuye la eficacia del proceso. Se determinó que la proporción óptima es de 1:8. Ver *Figura 10*.

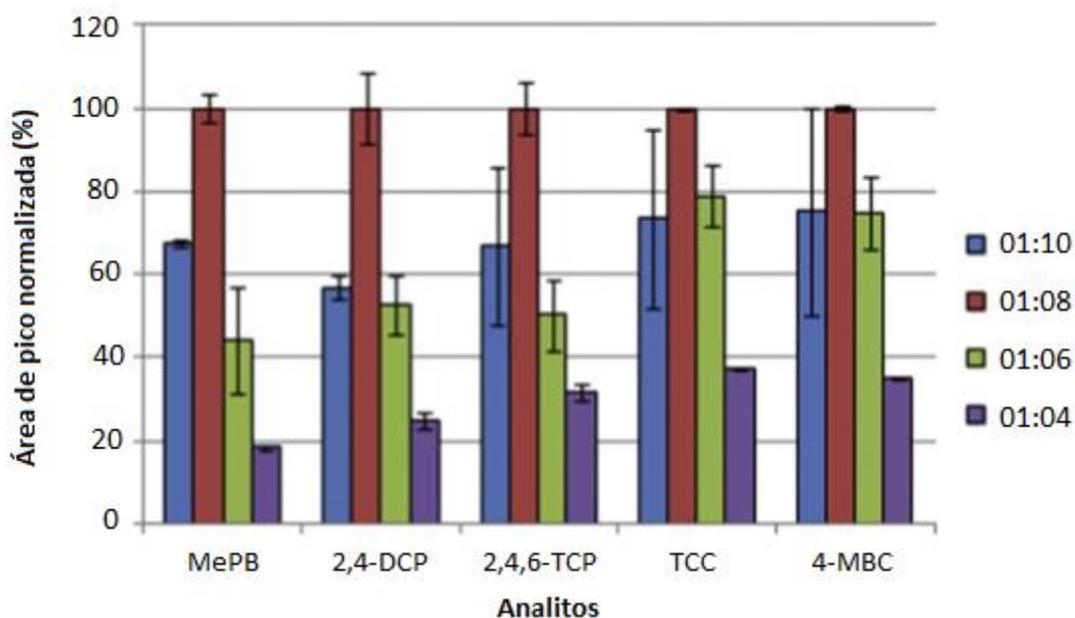


Figura 10. Efecto de la proporción de mezcla de disolvente extractante/dispersante.³⁷

Una vez se estableció la proporción óptima de mezcla extractante/dispersante, se determinó el volumen de mezcla más adecuado para llevar a cabo la extracción. El volumen más adecuado resultó ser de 50 μL (ver *Figura 11*).

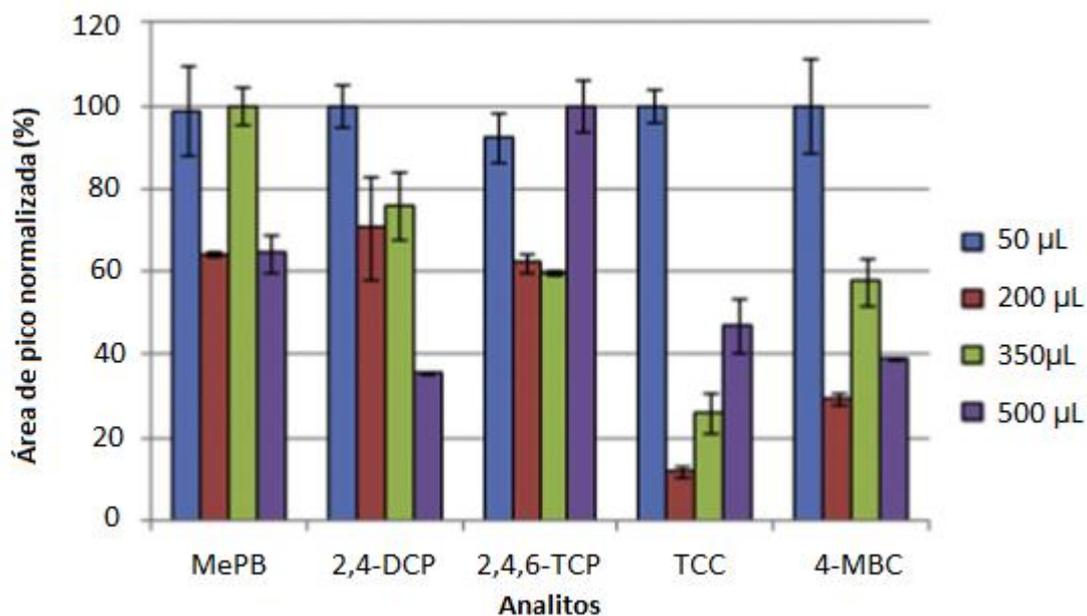


Figura 11. Efecto del volumen de mezcla de disolvente extractante/dispersante.³⁷

Finalmente, se estudiaron las condiciones más favorables para la desorción. Se obtuvo un tiempo de tratamiento de extractos para la desorción de 10 min, lo cual resulta compatible con una frecuencia alta de análisis en un laboratorio. Las pruebas a diferentes volúmenes de disolvente de desorción mostraron resultados similares para 100 y 150 μL . Se determinó el volumen más bajo como el óptimo para el proceso de desorción.

4.2. TRABAJOS SELECCIONADOS SOBRE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE AGUAS

En este epígrafe se introducirán algunos artículos científicos de investigaciones recientes relacionados con el análisis de aguas mediante GC, donde se ilustrarán cambios significativos que suponen estos avances en los laboratorios de análisis de aguas.

4.2.1.- Determinación de pesticidas en aguas residuales

Zhang y colaboradores³⁸ desarrollaron un método de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas híbrido de cuadrupolo – tiempo de vuelo (GC-QTOF MS). Se trata de un método de screening de residuos de pesticidas en matrices complejas, que puede ser aplicable a las aguas residuales (de composición muy variable y compleja habitualmente). Lo más relevante del estudio reside en la identificación y confirmación de los analitos, que tiene lugar en tres etapas: detección inicial, identificación preliminar y confirmación final (estructural) (ver *Figura 12*).

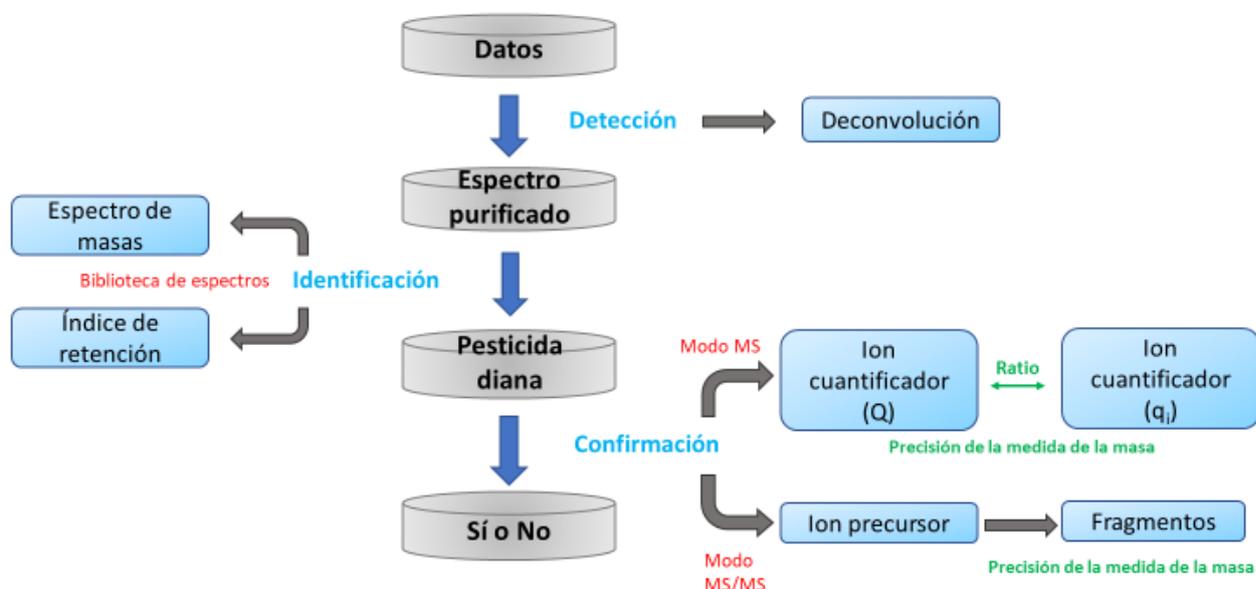


Figura 12. Flujo de trabajo empleado en el análisis de cribado empleando GC-QTOF MS. ³⁸

La *Figura 12* muestra las tres etapas en las que tiene lugar la detección, identificación y confirmación de los residuos de pesticidas contenidos en una matriz compleja, empleando GC-QTOF MS. Esta modalidad de análisis no determinado permite una multidetección de parámetros en una sola tanda analítica, convirtiéndose así en una de las herramientas más poderosas para este propósito. No obstante, este método requiere amplias librerías de espectros que pueden ir alimentándose con el trabajo rutinario del laboratorio, así como valores de masas para el sistema MS.

Pese a que el modo TOF-MS se ajustó adecuadamente para alta resolución, algunos factores como el tiempo muerto del detector o la abundancia de los iones pueden afectar decisivamente a la precisión de la medida e incluso causar un error en el valor de masa. Estos factores resultan más decisivos en las relaciones m/z bajas, debido a efecto matriz y a coeluciones de otras sustancias. A diferencia del TOF, el QTOF presenta algunas ventajas: la producción de iones está menos perturbada dando como resultado una mejora en la precisión de la masa, en la selectividad de los iones y por tanto en la capacidad de confirmación.

4.2.2.- Determinación de fármacos en aguas naturales y aguas residuales.

Un reciente estudio³⁹ realizado en 2016 se ha centrado en la determinación de residuos de antibióticos y otros medicamentos en muestras de agua bruta (ríos y lagunas) y agua residual. Recientemente, ha surgido la necesidad de determinar los residuos de los fármacos debido a los potenciales efectos que provocan en los ecosistemas y sobre la salud humana.

Para ello, se desarrolló un método que posibilita la determinación simultánea de 26 analitos diferentes, con un proceso de SPE off-line seguido de un análisis por on-line SPE-LC-MS/MS. Se evaluaron también los residuos de fármacos relacionados con la materia en suspensión, para ello, se empleó un proceso de tratamiento de muestra adicional basado en la extracción líquida presurizada (PLE) previo al resto de etapas mencionadas anteriormente. El proceso SPE *off-line* tiene como objeto purificar los extractos eliminando así las posibles interferencias, mientras que el SPE on-line permite preconcentrar los extractos para reducir el volumen de inyección en el LC-MS/MS. Esta combinación mejora la sensibilidad y el LOQ del método, además de permitir una línea base del cromatograma más limpia.

Los analitos que figuran en esta investigación se adjuntan a continuación en la *Figura 13*:

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE AGUAS DE CONSUMO Y RESIDUALES

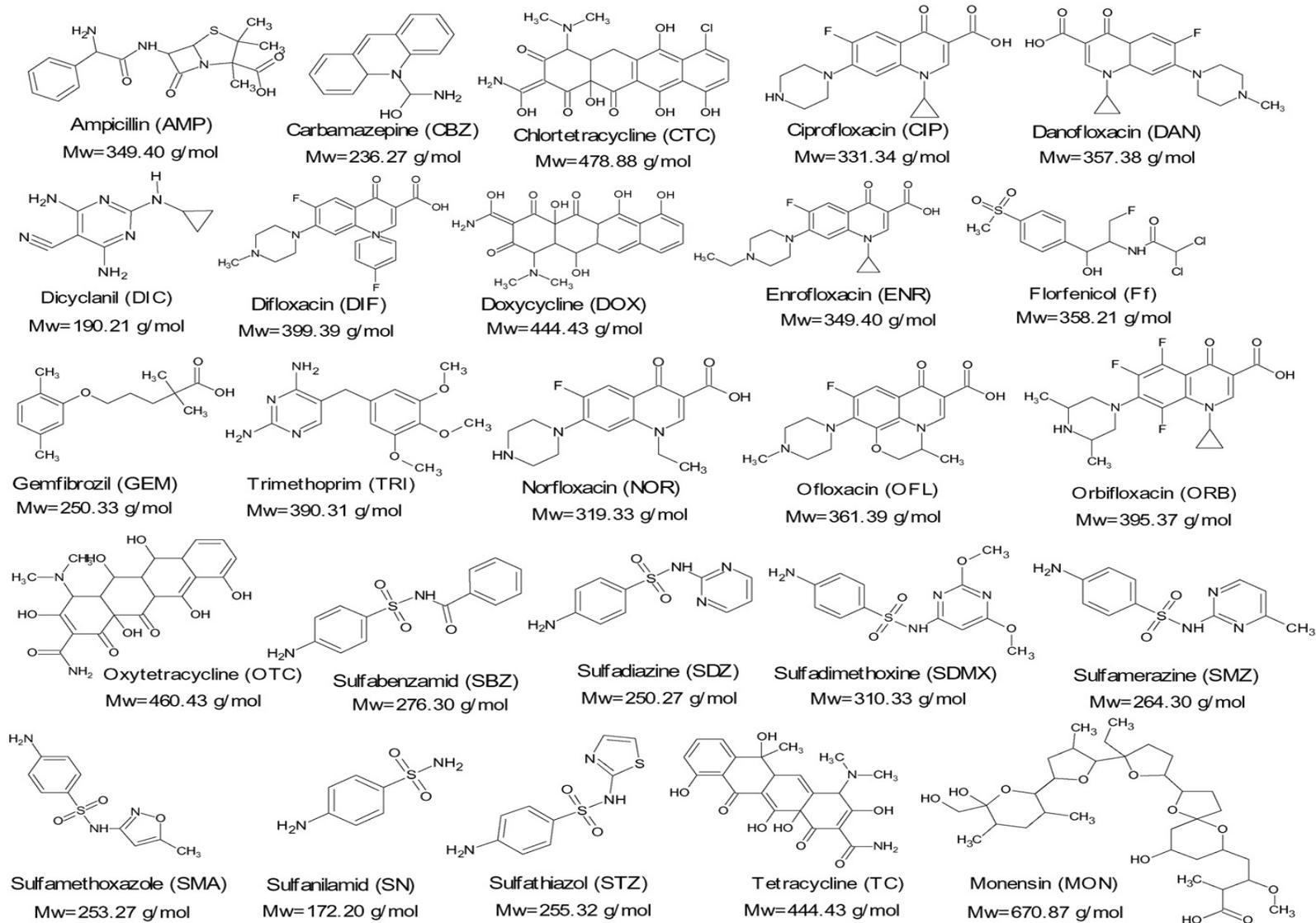


Figura 13. Estructuras, abreviaturas y pesos moleculares de los 26 antibióticos estudiados. ³⁹

Los reactivos empleados para estos análisis son de grado analítico o HPLC, y el agua destilada de calidad ultra-pura. En lo que se refiere a las muestras, fueron tomadas usando botellas de 2,5 L e inmediatamente tapadas con una tapa forrada de teflón. Una vez en el laboratorio, las muestras de agua se filtraron directamente utilizando vidrio y filtros de 0,45 μm de microfibras para separar la fase acuosa de la materia en suspensión.

El proceso de PLE se lleva a cabo en tres etapas:

- 1) Extracción con metanol. Se realiza a una temperatura de 80 °C y presión de 120 bar. Consta de dos ciclos con tiempos de extracción de 10 minutos cada uno. Se emplea nitrógeno de alta pureza como gas portador, obteniéndose extractos de 25 mL.
- 2) Extracción de las fluoroquinolonas. Se lleva a cabo con metanol/acetonitrilo (0,2 M) y ácido cítrico en proporción 40/40/20 v/v/v. a pH = 4,5.
- 3) Extracción de las tetraciclinas. Se lleva a cabo con metanol/acetonitrilo (0,2 M) y ácido cítrico en proporción 25/25/50 v/v/v a pH = 3,0.

Los extractos provenientes de las tres etapas se combinan y se preconcentran previo al análisis. Se evaluaron valores de pH de 2.5, 4.0, 5.5 y 7.0 para encontrar el pH óptimo de extracción. La SPE on-line se lleva a cabo empleando cartuchos de fase inversa C18. La columna cromatográfica utilizada es C18, también fase inversa.

Las condiciones cromatográficas de la separación se detallan a continuación en la *Tabla 9*:

Tabla 9. Condiciones cromatográficas de la separación.³⁹

Temperatura	40 °C
Modalidad	Gradiente
Composición de la fase móvil	A: 0,1% ácido fórmico y 0,1% acetato amónico en agua. B: 0,1% ácido fórmico en metanol.
Tiempo de análisis	25 minutos
Caudal	0,2 mL/min
Programa de análisis	1) 5 % A y 95 % B durante 5 minutos. 2) Aumento progresivo de B hasta llegar a composición (50 % A y 50 % B), del minuto 5 al minuto 20. 3) Se revierte la composición a la inicial y se mantiene durante 6 minutos.

Las condiciones de trabajo del detector (energía de colisión, potencial de las barras del cuadrupolo, voltaje del spray, temperatura de vaporización y temperatura del capilar) se optimizaron para lograr la identificación y cuantificación de residuos de 26 fármacos diferentes, entre ellos 18 antibióticos. Ver *Tabla 10*.

La linealidad del método se determinó empleando 16 patrones de concentraciones comprendidas entre 5 – 100.000 ng/L. Los coeficientes de correlación de los parámetros oscilan entre 0,97 – 1,00. El rango de trabajo para la mayoría de los analitos se encuentra entre 20 y 2.500 ng/L, lo que pone de manifiesto el amplio intervalo lineal del método. El LOQ de todos los compuestos salvo la sulfadazina es inferior a 0,5 ng/L.

Las condiciones óptimas de análisis fueron validadas analizando extractos de muestras dopadas con los patrones de trabajo, sobre las matrices de interés (aguas naturales y aguas residuales).

Tabla 10. Condiciones optimizadas para la detección, RT, LOQ de los analitos y de los patrones internos. ³⁹

Residuo (analito)	Ion padre m/z	Fragmentos m/z		Energía de colisión (V)		Lentes de tubo (V)	Voltaje del spray (V)	Temperatura de vapor (°C)	Temperatura del capilar (°C)	RT (min)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)
AMP	350.0	105.9	113.9	24	30	108.0	3000	394.9	202.9	11.37	0.5	0.15
CBZ	236.9	193.8	191.8	19	25	107.6	3000	325.7	186.0	11.48	0.2	0.06
CTC	479.1	462.0	443.8	21	16	95.0	3000	403.7	200.8	8.72	0.2	0.06
CIP	332.0	313.9	230.8	36	19	79.1	3000	399.1	227.8	6.47	0.2	0.06
DAN	358.0	339.7	313.9	23	17	84.0	3000	313.1	240.4	6.65	0.2	0.06
DIC	190.9	149.9	162.8	18	16	72.5	3000	198.8	242.1	4.36	0.5	0.15
DIF	400.0	381.9	355.9	21	19	98.0	3500	394.9	205.2	7.10	0.2	0.06
DOX	445.0	427.9	153.8	18	29	94.3	3000	279.3	233.3	9.86	0.2	0.06
ENR	360.0	342.0	315.9	20	18	110.3	3500	400.6	199.5	6.73	0.2	0.06
Ff	355.9	335.9	185.0	10	20	-113.8	4000	366.3	199.8	6.96	1.2	0.36
GEM	294.1	121.1	120.0	19	47	-102.4	4000	364.9	198.5	19.92	0.5	0.15
MON	693.3	675.3	461.1	35	52	135.6	3000	366.2	274.7	19.33	0.5	0.15
NOR	320.0	301.9	275.9	20	16	86.0	4000	357.2	232.7	6.43	0.5	0.15
OFL	362.0	317.9	260.8	17	26	94.0	3500	366.6	266.0	6.19	0.5	0.15
ORB	396.0	351.9	294.9	24	17	143.1	3500	404.9	210.0	6.91	0.5	0.15
OTC	461.1	425.9	443.1	19	12	87.0	3000	252.5	265.8	6.82	0.5	0.15
SBZ	276.9	155.8	108.0	13	22	71.0	3500	231.9	225.1	8.20	0.2	0.06
SDZ	250.9	155.8	108.0	15	22	90.6	5000	197.7	202.2	4.81	3	0.9
SDMX	310.9	155.9	108.0	21	27	87.6	3500	395.5	228.3	8.76	0.2	0.06
SMZ	264.9	155.9	171.8	15	16	85.0	5000	352.6	229.7	5.66	0.2	0.06
SMA	253.9	155.7	92.0	16	26	85.0	5000	350.6	228.4	7.03	0.2	0.06
SN	172.9	155.8	108.0	7	15	67.3	3000	235.0	248.4	2.78	0.2	0.06
STZ	255.9	155.9	108.0	14	24	116.0	4500	400.5	232.4	5.28	0.2	0.06
TC	445.1	409.9	427.0	18	12	72.0	4500	232.4	272.0	6.08	0.2	0.06
TRI	291.0	229.9	260.9	23	24	121.1	5000	352.1	329.7	5.77	0.2	0.06
TYL	916.6	173.7	772.3	35	26	149.0	4500	403.9	202.8	12.18	0.2	0.06
CBZ-D10	246.9	200.7	201.2	23	20	105	3000	300.0	190.0	11.32	-	-
SMA-D4	257.9	159.5	160.1	16	27	87	5000	350.1	233.7	6.86	-	-
TRI-D3	293.9	122.6	123.1	26	24	124.1	5000	342.1	322.7	5.99	-	-

El pH final de los extractos supone una influencia importante en la eficiencia de la detección de los parámetros cuando se emplea SPE-LC-MS/MS. Esto se puede comprobar de manera gráfica para los analitos determinados en este estudio al observar la *Figura 14*.

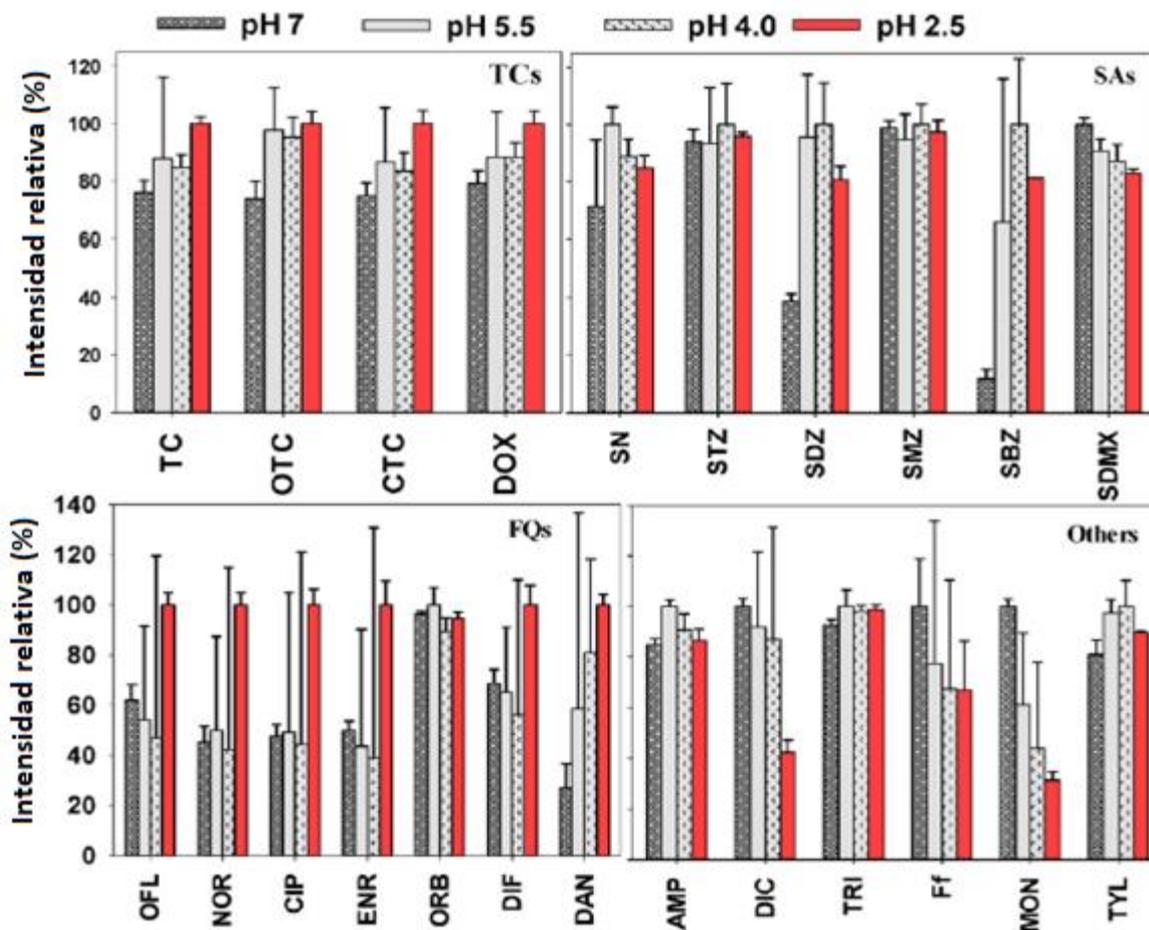


Figura 14. Efecto del pH del extracto final en la sensibilidad de la detección.³⁹

Un pH de 2,5 unidades (barra de color rojo) resultó ser el más adecuado para la mayoría de los compuestos (24 de los 26 estudiados).

4.2.3.- Determinación de microcistinas en aguas naturales

En un trabajo de 2017 ⁴⁰ se desarrolla un método analítico multiresiduo selectivo basado en LC-MS/MS para la determinación de microcistinas (MCs) en agua, dando así cumplimiento a la legislación italiana (coincide con la española, ver *Tabla 1*), que establece un valor paramétrico de 1,0 µg/L en agua de consumo.

Las Cianobacterias (microalgas azules y verdes) cuentan con algunas variedades que pueden producir cianotoxinas. Estas toxinas causan mortandad en animales y dañan la salud de los seres humanos cuando se encuentran presentes en aguas de consumo. Las MCs son tóxicas por inhalación, por contacto con la piel y por ingestión; causan irritación en el tracto respiratorio, ojos y piel, así como daños hepáticos. Este estudio ha concluido con el desarrollo de un método selectivo para la determinación de 12 microcistinas: MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-LW, MC-LF, MC-LY, D-Asp-MC-RR, D-Asp-MC-LR, MC-WR, MC-HiIR, MC-HtyR.

Para la puesta a punto del método, se adquirieron patrones comerciales de estos 12 analitos así como de nodularin (que se empleó como patrón interno adicionado directamente a las muestras, antes de la etapa de tratamiento de muestra). Las disoluciones patrón se disolvieron en 2 mL de metanol y se conservaron a – 18 °C en oscuridad, para minimizar la degradación de los analitos. Las disoluciones de trabajo de los patrones y del IS fueron preparadas a través de dilución de las disoluciones patrón con fase móvil, alcanzando concentraciones finales de 1 µg/mL y 5 µg/mL respectivamente.

El muestreo se llevó a cabo en el Lago Occhito (provincial de Foggia, Italia) entre los meses de enero de 2010 y mayo 2011. Los puntos de muestreo seleccionados fueron los siguientes:

- 1) Entrada del río al embalse, profundidad 1 m.
- 2) Próximo a la presa, profundidad 34 m.
- 3) Próximo a la presa, profundidad 16 m.
- 4) Próximo a la presa, profundidad 1 m.
- 5) Zona central del embalse, profundidad 24 m.
- 6) Zona central del embalse, profundidad 12 m.
- 7) Zona central del embalse, profundidad 1 m.

Las muestras se conservaron a – 18 °C y fueron analizadas tras el ciclo de congelación/descongelación.

El proceso de tratamiento de muestra está basado en una SPE. Para ello, se toman 250 mL de muestra descongelada, se transfieren a botellas de vidrio y se adiciona IS hasta tener una concentración teórica final de 1,0 µg/L. A continuación, se filtran las muestras con un filtro de papel redondo de 125 mm de diámetro y acto seguido se transfieren a los cartuchos de extracción. Todas las muestras se tratan con Na₂S₂O₃ para evitar la oxidación del IS. Las MCs

se eluyen con 1 mL de metanol seguido de 6 mL de diclorometano/metanol (80:20 v/v) que contiene ácido trifluoroacético 10 mM. Los extractos se evaporan hasta un volumen final de 50 μ L empleando un concentrador de corriente de nitrógeno. Finalmente, se reconstituyen los extractos con 1 mL de agua/acetonitrilo (70:30 v/v), y de estos se inyectan 50 μ L en la columna de LC.

El análisis cromatográfico se realizó empleando una columna C18 termostata a 40 °C. El módulo de HPLC cuenta con una interfaz de *Spray Turbo Ion* que conecta la columna con el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (3Q-MS) API 3000, que opera en modo fuente de iones electrospray en modo positivo. La fase móvil está compuesta de acetonitrilo (A) y agua (B), ambas contienen 10 mM de ácido fórmico. El flujo programado para la separación es de 0,2 mL/min. El detector opera en modo control de reacción seleccionado (SRM) para efectuar la cuantificación de dos transiciones SRM por cada analito.

La cuantificación en LC-MS/MS se realiza a partir del área del pico cromatográfico de cada analito, seleccionando aquella transición que presente una mayor intensidad señal-ruido relacionada con el área del IS. La ratio (área del analito/área del IS) se emplea para efectuar la curva de calibrado. Se evaluaron LODs a partir del nivel más bajo de calibración, obteniéndose recuperaciones comprendidas entre 70 – 120 % con RSD \leq 20 %.

El protocolo de validación del método incluye la evaluación de veracidad, precisión y LODs (comprendidos entre 0,003 – 0,030 μ g/L para todos los analitos); mediante pruebas de repetibilidad y precisión intermedia (diferentes días con distintos operadores). También se realizaron estudios de selectividad, efecto matriz, linealidad y estabilidad. Para la construcción del calibrado, se forzó la ordenada en el origen a partir de los resultados provenientes del análisis de tres muestras de blanco. Mediante la utilización del método ANOVA de un factor, se determinó que no existe efecto matriz con una significación de $\alpha = 0,05$; para ello, se analizaron tres réplicas de cada matriz con la precisión requerida a una concentración de 1/10 veces el valor paramétrico (0,10 μ g/L). El estudio de sensibilidad y linealidad se llevó a cabo a partir de agua desionizada dopada a niveles de 0,10; 0,5; 1,0 y 2,5 μ g/L. Los coeficientes de correlación obtenidos en el ajuste instrumental están comprendidos entre 0,9925 – 0,9998, que ponen de manifiesto una excelente linealidad. El patrón interno empleado (nodularin), se empleó como parámetro de control de calidad durante los ensayos, proporcionando una robustez al protocolo mencionado de 82 ± 12 % en un total de 69 muestras analizadas. Por tanto, la veracidad declarada en la validación del método es de 74 – 110 %, con una reproducibilidad inferior al 19 % en el rango de concentraciones de 0,025 – 0,1 μ g/L).

4.2.4.- Determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales y de consumo

Kodamatani y colaboradores ⁴¹ desarrollaron un método analítico para la determinación simultánea de ion nitrato (NO_3^-) e ion nitrito (NO_2^-) en muestras de agua (río, embalse, lluvia, grifo y agua mineral embotellada). El método se basa en una separación por intercambio iónico, seguido de una reacción fotoquímica post-columna y una detección quimioluminiscente con luminol.

Los iones nitrato y nitrito son importantes indicadores de calidad de las aguas, ya que elevadas cantidades de estas especies pueden ser tóxicas y dar lugar a fenómenos de eutrofización. Existen multitud de métodos analíticos para realizar la determinación de estos iones, que incluyen la cromatografía iónica entre otros. La determinación selectiva de nitrito por el método de Griess es la más famosa, está basada en una reacción de diazotación con un grupo amino aromático seguido de un acoplamiento para formar así un colorante azoico. A partir de este, se pueden realizar detecciones colorimétricas, fluorimétricas, electroquímicas y quimioluminiscentes. Entre todas las alternativas mencionadas, los métodos luminiscentes son los más indicados debido a su selectividad y sensibilidad. Uno de los más efectivos es un método quimioluminiscente en fase gaseosa basado en la reducción del nitrito en óxido nítrico (NO), el cual produce quimioluminiscencia al reaccionar con ozono. Para poder realizar la determinación del ion nitrato, se requiere una etapa de reducción previa para transformarlo en nitrito. Las formas más habituales de hacerlo son empleando una foto-reducción que utiliza una lámpara de vapor de mercurio a baja presión o bien haciendo pasar a la disolución a través de una columna dopada con cobre y cadmio. Sin embargo, se ha encontrado que existe una manera más sencilla de llegar a la detección quimioluminiscente a través de una reacción entre peroxinitrito y luminol, la cual puede producirse a partir de nitrato y nitrito con empleo de radiación UV, lo que simplifica radicalmente el sistema de detección.

Se trata del método más simple y más sensible para la determinación de estos dos parámetros que se ha reportado hasta el momento.

La *Figura 15* muestra un esquema de las partes del cromatógrafo iónico utilizado.

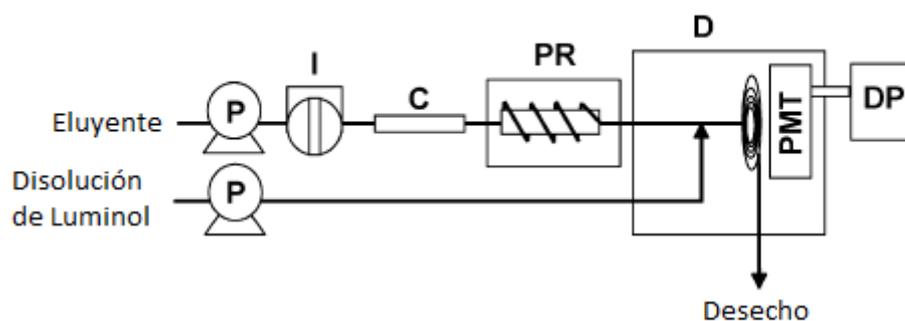


Diagrama esquemático del cromatógrafo iónico utilizado. P - bomba; I - inyector (100 μ L); C - columna de intercambio aniónico; PR - reactor fotoquímico; D - detector quimioluminiscente; PMT - tubo fotomultiplicador; DP - procesador de datos.

Figura 15. Esquema de un sistema de IC utilizado para determinar NO_3^- y NO_2^- en agua. ⁴¹

Para optimizar las condiciones experimentales se realizaron varios experimentos utilizando el sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). Para lograr una sensibilidad elevada, se optimizaron parámetros de la reacción fotoquímica y quimioluminiscente. El efecto que produce el tiempo de irradiación con UV sobre la intensidad de la quimioluminiscencia se muestra en la *Figura 16*. Se comprobó experimentalmente que la altura de los picos del cromatograma correspondientes al nitrato y al nitrito aumentaban hasta los 30 s de irradiación, y luego disminuían. En base a esta observación, se fija en 30 s el tiempo de irradiación con UV.

El efecto que produce el pH del eluyente también fue objeto de optimización. La *Figura 17* muestra cómo varía la intensidad quimioluminiscente de los analitos de interés en función del pH. Se observó que la intensidad aumentaba hasta llegar a un valor de pH 12, sin embargo, también aumentaba el ruido de fondo. Dado que un pH elevado daña la columna y que el ruido de fondo se mantiene constante hasta pH 10, se toma este valor de pH como óptimo.

También se estudió la influencia de la concentración del tampón borato, en un rango de 0 – 100 mM. Las alturas de pico y el ruido de fondo se mantienen constantes hasta 20 mM, donde aumentan ligeramente para posteriormente disminuir. Se toma el valor de 20 mM como concentración óptima.

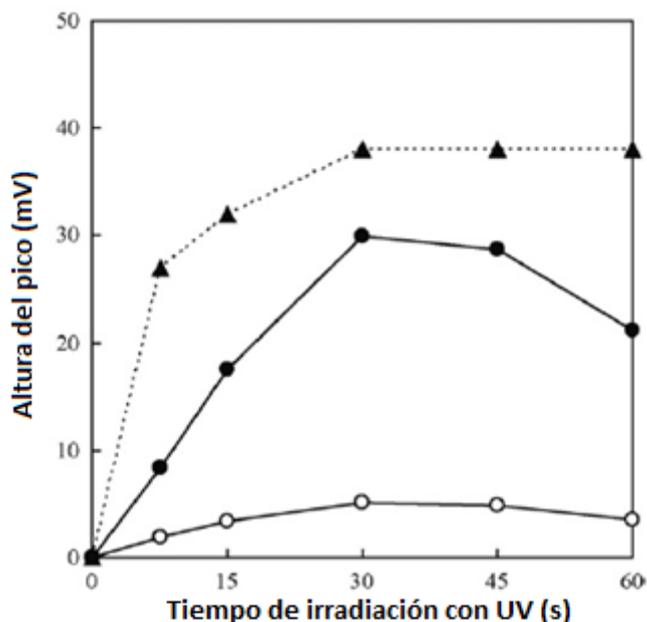


Figura 16. Efecto del tiempo de irradiación UV sobre la intensidad de la quimioluminiscencia.⁴¹

Efecto del tiempo de radiación UV sobre la intensidad de la reacción quimioluminiscente. Muestra: nitrito (●), 1.0 μM ; nitrato (○), 1.0 μM . Ruido de fondo (▲). Condiciones: eluyente, 20 mM de disolución tampón de borato - metanol (98:2, v/v, pH 10.0); flujo: 1.0mL/min.

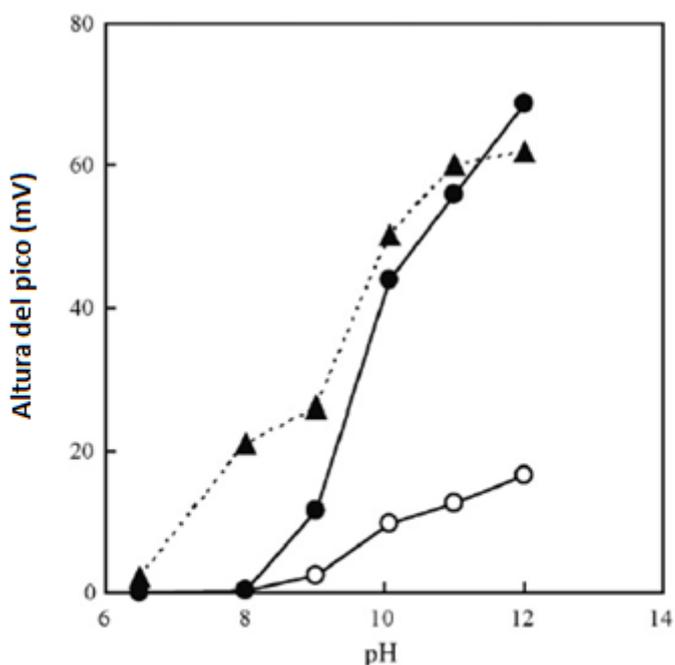
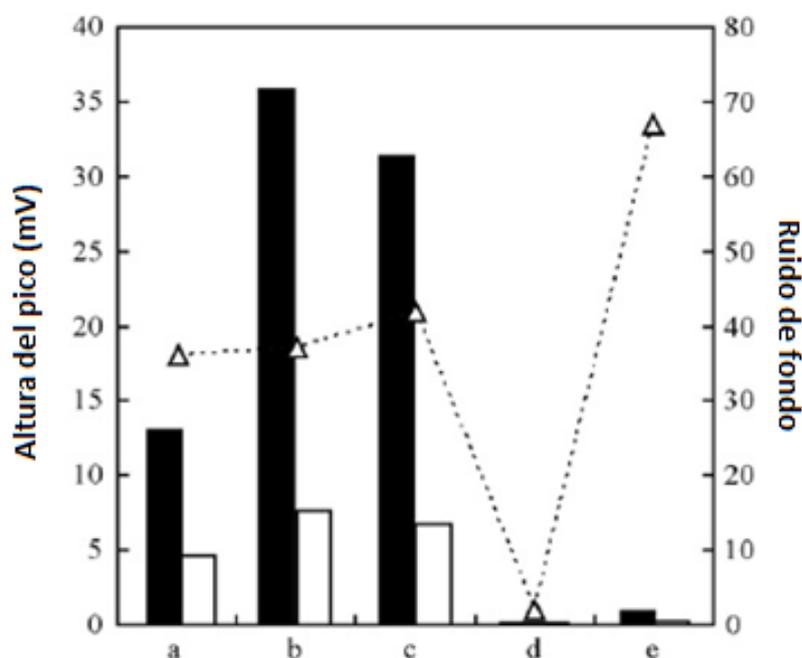


Figura 17. Efecto del pH sobre la intensidad de la quimioluminiscencia.⁴¹

Efecto del pH sobre la intensidad de la reacción quimioluminiscente. Muestra: nitrito (●), 1.0 μM ; nitrato (○) 1.0 μM . Ruido de fondo (▲). Condiciones: eluyente, 20 mM de disolución tampón de borato - metanol (98:2, v/v, pH 10.0); flujo: 1.0mL/min.

Para seguir mejorando la sensibilidad del método, se hicieron pruebas con varios modificadores adicionados al eluyente. Cuando se añadió metanol, se observó que las alturas de pico del nitrato y del nitrito aumentaron en comparación a las obtenidas cuando se utilizaba únicamente el tampón. Esto es debido a la tendencia que tiene el metanol de formar radicales en reacciones fotoquímicas, estas especies favorecen la reacción fotoquímica del nitrato y del nitrito. También se realizaron pruebas con acetona, la cual produjo un significativo decaimiento en la intensidad quimioluminiscente de analitos y ruido de fondo. Este comportamiento de bloqueo de la reacción fotoquímica se atribuye a la banda de absorción que presenta la acetona en torno a los 300 nm. Por último, se hicieron pruebas con acetonitrilo, que resultó disminuir la señal del nitrato y del nitrito sin disminuir la proporcionada por el ruido de fondo. Este comportamiento no tiene una justificación evidente en la actualidad. Por lo mencionado anteriormente, se decidió emplear metanol al 2% como modificador de la fase móvil. Ver *Figura 18*.



Efecto del modificador orgánico sobre la intensidad de la reacción quimioluminiscente. Condiciones: eluyente, 10 mM de disolución tampón de borato (pH 10.0) - disolvente orgánico; flujo del eluyente, 1.0 mL/min. Muestra: nitrito (■), 1.0 M; nitrato (□), 1.0 M. Ruido de fondo (▲). (a) disolución tampón, (b) 2% metanol; (c) 10 % metanol; (d) 2% acetona; (e) 2% acetonitrilo.

Figura 18. Efecto del modificador sobre la intensidad de la quimioluminiscencia de los analitos y del ruido de fondo.⁴¹

Finalmente, se optimizó el valor de la velocidad de flujo. Para ello, se hicieron pruebas en el intervalo de 0,5 – 2,0 mL/min. Las alturas de pico aumentaron progresivamente al incrementar el flujo, hasta llegar a un valor de 1,5 mL/min. Por tanto, se utilizó este valor de velocidad de flujo para este trabajo.

En estas determinaciones, se logró una separación efectiva en el cromatograma de los picos del nitrato y del nitrito, con un tiempo de análisis de 8 minutos. El comportamiento del método ha demostrado ser lineal para el nitrito y el nitrato en el intervalo de concentraciones de $2,0 \cdot 10^{-9}$ – $2,5 \cdot 10^{-6}$ M y $2,0 \cdot 10^{-8}$ – $2,5 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente. Los coeficientes de determinación de las curvas de calibrado fueron en ambos casos de $r^2 = 0,9999$. Los LODs se calcularon a partir de la señal de la línea base, obteniéndose: LOD (NO_2^-): 2,0 nM y LOD (NO_3^-): 10 nM.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- Técnicas de extracción utilizadas en determinaciones de compuestos productores de olor
(Corresponde a la sección 4.1.1)

Las determinaciones de compuestos volátiles y semivolátiles no suelen resultar sencillas ya que hay que tomar muchas precauciones a la hora de manipular las muestras para evitar contaminaciones procedentes del laboratorio, como perfumes u otros productos de higiene personal. Además, se deben tomar precauciones para evitar pérdidas de analito durante el muestreo y el análisis, especialmente en etapas de preconcentración que impliquen eliminación de disolvente.

Además de las técnicas de extracción en fase sólida reflejadas en la *Tabla 8*, en este estudio se mencionan técnicas de LLE. La DLLME proporciona factores de enriquecimiento elevados en un corto espacio de tiempo, con bajo consumo de disolvente y es totalmente compatible con separaciones en GC. Se han reportado métodos de análisis de clorofenoles en agua empleando DLLME combinado con cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC-ECD), con LOD comprendidos entre 0,010 – 2.0 µg/L. La microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos (USA-EME) se fundamenta en un aumento de la capacidad de extracción de la fase orgánica al generarse una emulsión (aumento de la superficie de contacto). Empleando esta técnica se ha logrado determinar 2,4,6-TCA en aguas mediante GC-MS/MS con valores de LOD realmente bajos (0,6 – 0,7 ng/L). Finalmente, se menciona otra técnica de extracción, la microextracción por gota única (SDME), donde la microextracción y la preconcentración tienen lugar en la misma etapa. Se han realizado determinaciones de GSM y MIB mediante HS-SDME en agua de grifo a muy bajos niveles de concentración. Algunas modificaciones propuestas al sistema de DLLME normal incluyen el empleo de disolventes de baja densidad o líquidos iónicos, más respetuosos con el medio ambiente.

Los detectores empleados en estos análisis son variados, siendo los más comunes los de espectrometría de masas. Otros detectores habituales son el ECD y el AED. Recientemente, se ha comenzado a utilizar la cromatografía multidimensional para estos análisis (MDGC), resolviendo los problemas de coelución de la cromatografía clásica monodimensional. En lo que respecta a la espectrometría de masas, los detectores utilizados para la determinación de productores de olor comprenden desde el simple cuadrupolo trabajando en modo SIM hasta aquellos con una alta sensibilidad como los 3Q-MS/MS.

- Técnicas de extracción utilizadas en determinaciones de contaminantes emergentes en matrices acuosas

(Corresponde a la sección 4.1.2)

La técnica de extracción HF-DLLME acoplada a un sistema de separación/detección LC-DAD ha resultado ser adecuada para la determinación de al menos cinco contaminantes emergentes, con resultados de exactitud y precisión satisfactorios. Las pruebas de veracidad generaron intervalos de recuperaciones comprendidos entre 78 y 135 %, con valores de RSD inferiores a 18% en todos los casos. Los LOD de estos cinco parámetros evaluados están comprendidos entre 0,9 y 3,0 µg/L, que resultan ser hasta 15 veces menores que los obtenidos por otros métodos de referencia encontrados en la bibliografía. Los LOQ obtenidos son de 2,5 a 10 µg/L, lo que supone otra cualidad reseñable del método analítico desarrollado. Además, el método resultó ser económico, respetuoso con el medio ambiente (requiere pequeños volúmenes de disolvente para llevar a cabo los procesos de extracción) y relativamente rápido comparado con otros métodos de referencia encontrados en la bibliografía. Otro aspecto interesante a destacar es que se eliminan todo tipo de problemas de *carryover* (contaminaciones por arrastre) al no reutilizarse membranas. Todas estas características hacen del método una alternativa interesante para los laboratorios.

- Determinación de pesticidas en aguas residuales

(Corresponde a la sección 4.2.1)

Debido a la sensibilidad tan pobre que ofrece el cuadrupolo en MS y la baja selectividad de la trampa de iones en MS en modo "full scan", su aplicación para determinar residuos de pesticidas en matrices complejas es limitada. Sin embargo, la espectrometría de masas empleando cuadrupolo con tiempo de vuelo (QTOF MS), con las modalidades de MS y MS/MS es la opción más recomendable en muestras complejas. Con esta modalidad de espectrometría de masas, se garantiza un alto poder de resolución, estrechándose así las ventanas de masa. Como consecuencia, se disminuye el ruido de fondo de los cromatogramas incrementándose así la selectividad y la sensibilidad. Finalmente, cabe destacar que el sistema MS/MS es capaz de producir la disociación de múltiples iones precursores en un único ciclo de análisis.

- Determinación de fármacos en aguas naturales y aguas residuales
(Corresponde a la sección 4.2.2)

Los principales parámetros que afectan a la detección de 26 residuos de medicamentos (de uso animal y humano) se han optimizado utilizando una combinación de procedimientos SPE “*off line*” y SPE-LC-MS/MS “*on line*”. El enfoque de utilizar la SPE previamente, para a continuación cuantificar por SPE-LC-MS/MS, permite tanto concentrar el extracto como eliminar las posibles interferencias que acompañan a la muestra. La línea base del cromatograma y la sensibilidad del método se ven claramente beneficiadas, obteniéndose así bajos LOQ. Cabe destacar la influencia del pH en la sensibilidad de la detección, que está condicionada por las propiedades anfóteras de cada compuesto. Esto está justificado a partir de los valores de pKa de muchos de los fármacos estudiados, ya que muchos de ellos muestran solubilidades muy bajas en agua a pH comprendido entre 6 – 8. Se comportan en ocasiones como ácidos débiles y forman sales en medios fuertemente ácidos o básicos. Por ello, el pH de los extractos se fijó en 2,5 unidades.

El monitoreo de los contaminantes emergentes no está todavía bien establecido, y actualmente se están realizando numerosos estudios sobre el comportamiento de estas sustancias en el medioambiente, así como sus capacidades de movilidad y dispersión en el medio acuático. En muchas de las muestras analizadas se detectaron niveles de contaminación considerables, poniendo de manifiesto que los procesos actuales de depuración son ineficaces a la hora de eliminar estos contaminantes de las aguas.

- Determinación de microcistinas en aguas naturales
(Corresponde a la sección 4.2.3)

Esta investigación ha concluido con la puesta a punto de un método cuantitativo de análisis multirresiduo de microcistinas en aguas destinadas al consumo humano. Italia y otros países de la Unión Europea han propuesto un valor paramétrico de MCs en agua a partir de la suma de todas las MCs cuantificables, permaneciendo a la espera de que la OMS establezca dicho valor a partir de investigaciones toxicológicas. Este estudio sirve de base para futuras investigaciones en el ámbito de la ecología que basen sus análisis en un método selectivo multirresiduo LC-MS/MS como el que se ha mencionado. El empleo de nodularín como patrón interno (subrogado) permite determinar las pérdidas de analito durante todo el proceso de tratamiento de muestra y análisis cromatográfico, sirviendo además de base para el cálculo de parámetros de validación como son la veracidad y la robustez del método analítico.

- Determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales y de consumo
(Corresponde a la sección 4.2.4)

Para llevar a cabo la validación del método, se emplearon otros métodos de referencia para llevar a cabo una comparación. Para el nitrito se empleó el método de Griess, y para el nitrato se hizo una comparación con detección por IC-conductividad. En general, la concentración de nitrito en aguas naturales es dos o tres órdenes de magnitud inferior a la de nitrato, por lo que la detección simultánea con métodos convencionales no es adecuada. En el método propuesto en este estudio, la sensibilidad del nitrito es 10 veces superior a la del nitrato, con intervalos lineales de tres órdenes de magnitud; siendo por tanto posible llevar a cabo una detección simultánea de manera eficaz. El fundamento de este método se basa en la reacción fotoquímica on-line del nitrato y del nitrito con transformación en peroxinitrito, para acto seguido dar lugar a la reacción quimioluminiscente entre el luminol y el peróxido formado.

El futuro de las técnicas cromatográficas en los laboratorios de análisis de aguas está garantizado. La tendencia actual es que la cromatografía vaya acaparando un mayor número de análisis cada vez, debido entre otras cosas a la capacidad que posee para realizar determinaciones múltiples. Este hecho se pone claramente de manifiesto a través de la cromatografía iónica, que agrupa en una sola técnica la determinación de muchos iones que tradicionalmente se identificaban por métodos diferentes.

6. CONCLUSIONES

Los objetivos propuestos al inicio de este trabajo (ver sección 2) se han cubierto satisfactoriamente a lo largo del documento. El muestreo, los métodos de extracción y el propio análisis cromatográfico se han tratado desde un punto de vista tanto teórico como práctico, manteniendo en todo momento un contexto de análisis de muestras de agua de consumo y residuales.

Un hecho fundamental que ha impulsado el desarrollo de las técnicas cromatográficas, y más concretamente la creación de nuevos métodos cromatográficos aplicados al análisis de aguas, es el intervalo de concentraciones en el que suelen aparecer determinados compuestos. Los métodos clásicos de análisis químico carecen de la sensibilidad y selectividad necesarias para dar cumplimiento a las exigencias contempladas en la legislación de aguas. Las concentraciones máximas admisibles de ciertos compuestos en agua, tales como los pesticidas o los productores de olor, son tan bajas que resultan indetectables para la mayoría de las técnicas analíticas de rutina de un laboratorio. Los avances que experimentan las técnicas cromatográficas y los sistemas de detección acoplados a estas redundan en un mayor control analítico de las aguas, exigido siempre por la administración.

Los métodos de extracción suponen una herramienta esencial en el análisis cromatográfico de muestras de agua. La presencia de interferentes (especialmente en aguas residuales) así como el contenido tan escaso de analito en la muestra hacen que la etapa de tratamiento de muestra sea prácticamente imprescindible. El empleo de métodos clásicos de extracción como LLE y SPE presentan algunas desventajas como son la utilización de grandes volúmenes de disolvente, frecuentemente tóxicos; además, resultan ser procesos lentos. Otros métodos de extracción más modernos como la DLLME se detallan en este estudio.

Las líneas de investigación en cromatografía aplicada al análisis de aguas se dividen en dos grandes vertientes: las que persiguen perfeccionar métodos existentes (*H. Kodamatani et al.*)⁴¹ y aquellas que buscan desarrollar métodos nuevos (*I. Tlili et al.*)³⁹. Existen algunas formas más complejas de aplicar la cromatografía, como es la cromatografía bidimensional, que todavía no se han implantado en los laboratorios que realizan análisis de aguas de rutina. El empleo de estos métodos ofrece una capacidad de separación muy superior, sin embargo, es posible que actualmente no resulten viables para realizar análisis de un gran volumen de muestras.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Catalán Lafuente, J. Química del Agua. Ed. Bellisco, Madrid, 1990.
- 2.- <https://agua.org.mx/que-es/> (acceso 25 de marzo de 2018).
- 3.- MARTÍNEZ R, RODRÍGUEZ J, SÁNCHEZ L. Química, un proyecto de la American Chemical Society, Ed. Reverte, 2007.
- 4.- http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/es/ (acceso 10 de abril de 2018).
- 5.- Batterman S, Eisenberg J, Hardin R, Kruk ME, Lemos MC, Michalak AM, Mukherjee B, Renne E, Stein H, Watkins C and Wilson ML. Sustainable Control of Water-Related Infectious Diseases: A Review and Proposal for Interdisciplinary Health-Based Systems Research. *Environ Health Perspect.* **2009**, 117, 1023 – 1032.
- 6.- <https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem> (acceso 17 de mayo de 2018).
- 7.- Bartual Sánchez J. & Berenger Subirlis M. J. NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales. Instituto nacional de Seguridad e higiene en el trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos sociales. España.
- 8.- Shala L, Massoud P. and McGuire MJ. Evaluating Activated Carbons for Removing Low Concentrations of Taste- and Odor-Producing Organice. *Journal (American Water Works Association)*. Distribution System Problems, **1986**, Vol. 78, No. 11, pp. 76 – 82.
- 9.- Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición. Ministerio de sanidad, consumo y bien estar. Gobierno de España. http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/haps.htm (acceso 21 de mayo de 2018).
- 10.- Organización mundial de la salud. Acrylamide in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/71.

- 11.- <http://www.zeulab.com/blog/microcistinas-y-su-deteccion-en-agua/> (acceso 30 de mayo de 2018).
- 12.- Clesceri L.S, Greenberg A. E, Trussell R. R. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 17º Edición; Ediciones Díaz de Santos S.A.: Madrid, **2001**. pp 3-1 – 3-102.
- 13.- Núñez L, Tornello C, Puentes N, Moreton J. Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. *Ambi-Agua*, Taubaté, **2012**; vol. 7, n. 1, p. 235 – 243.
- 14.- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.
<https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/saludAmbLaboral/calidadAguas/legislacion.htm> (acceso 01 de junio de 2018).
- 15.- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Ministerio de la Presidencia para las administraciones territoriales.
- 16.- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. (BOE 294 de 8/12/2007). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.
- 17.- DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.
- 18.- Rice E.W, Baird R. B, Eaton A. D, Clesceri L. S. Collection and preservation of samples. In Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22º Edición, Baltimore, Maryland, USA, **2012**; pp 1-37 – 1-46.
- 19.- UNE-EN-ISO 5667-3:2012. *Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Conservación y manipulación de las muestras de agua.*
- 20.- Llorcaa M, Grosa M, Rodríguez-Mozaza S, Barceló D. Sample preservation for the analysis of antibiotics in wáter. *Journal of Chromatography A*, **2014**; vol. 1369 pp 43 – 51.

- 21.-** Moreno Cordero B, Pérez Pavón JL, García Pinto C, Fernández Laespada ME, Carabias Martínez R, Rodríguez Gonzalo E. Analytical applications of membrane extraction in chromatography and electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **2000**; vol. 902 pp 195 – 204.
- 22.-** Rubirola A, Boleda MR, Galceran MT. Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, **2017**; vol. 1493 pp 64 – 75.
- 23.-** Bruzzoniti MC, Sarzanini C, Mentasti E. Preconcentration of contaminants in water analysis. *Journal of Chromatography A*, **2000**; vol. 902 pp 289 – 309.
- 24.-** Bourdat-Deschamps M, Leanga S, Berneta N, Daudinb JJ, Nélieu S. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction–ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. *Journal of Chromatography A*, **2014**; vol. 1349 pp 11 – 23.
- 25.-** Afonso-Olivares C, Cadková T, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ, Nováková L. Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. *Journal of Chromatography A*, **2017**; vol. 1487 pp 54 – 63
- 26.-** Munoz G, Duya SV, Roy-Lachapelle A, Huskc B, Sauvé S. Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2017**; vol. 1516 pp 9 – 20.
- 27.-** Baños CE, Silva M. Comparison of several sorbents for continuous in situ derivatization and preconcentration of low-molecular mass aldehydes prior to liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination in water samples. *Journal of Chromatography A*, **2009**; vol. 1216 pp 6554 – 6559.

- 28.-** Beránek J, Kubátová A. Evaluation of solid-phase microextraction methods for determination of trace concentration aldehydes in aqueous solution. *Journal of Chromatography A*, **2008**; vol. 1209 pp 44 – 54.
- 29.-** http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html (acceso 20 de junio de 2018).
- 30.-** López Salas S, Urraco Solanilla M, Gallardo Vázquez D. Catálogo de investigación joven en Extremadura, Cáceres, **2018**; Volumen II. Capítulo 49, pp 307 – 310.
- 31.-** Herrera de Pablo, J.C. Aplicación de las técnicas de extracción con fluidos supercríticos (SFE) y cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MSD) al análisis de residuos de bupropión en frutas y hortalizas. Tesis doctoral, Facultad de ciencias experimentales de la Universidad de Almería, **2002**.
- 32.-** Zhang, Ch. Fundamental of Environmental Sampling and Analysis. Ed. Wiley, **2007**.
- 33.-** Jennings W, Mittlefehjt E, Stremple P. Analytical Gas Chromatography. Academic Press, 2º Edition, **1997**.
- 34.-** Ahuja S. Chromatographic and separation science. 4º Ed. Academic Press, **2003**.
- 35.-** Michalski R. Ion Chromatography Applications in Wastewater Analysis. *Separations*, **2018**; vol. 5, art. 16.
- 36.-** Callejón R.M, Úbeda C, Ríos-Reina R, Morales M.L, Troncoso A.M. Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review. *Journal of Chromatography A*, **2016**; vol. 1428 pp 72 – 85.
- 37.-** Lopes D, Neves Dias A, Simão V, Carasek E. Determination of emerging contaminants in aqueous matrices with hollow fiber-supported dispersive liquid-liquid microextraction (HF-DLLME) and separation/detection by liquid chromatography – Diode array detection. **2017**; *Microchemical Journal*, vol. 130, pp 371 – 376.

38.- Zhang F, Wang H, Zhang L, Zhang J, Fan R, Yu C, Wang W, Guo Y. Suspected-target pesticide screening using gas chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry with high resolution deconvolution and retention index/mass spectrum library. *Talanta*, **2014**; vol. 128, pp 156 – 163.

39.- Tlili I, Caria G, Ouddane B, Ghorbel-Abid I, Ternane R, Trabelsi-Ayadi M & Net S. Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application. *Science of the Total Environment*, **2016**; vol. 563–564, pp 424 – 433.

40.- Nigro Di Gregorio F, Bogialli S, Ferretti E, Lucentini L. First evidence of MC-HtyR associated to a *Plankthothrix rubescens* blooming in an Italian lake based on a LC-MS method for routinely analysis of twelve microcystins in freshwaters. *Microchemical Journal*. **2017**; vol. 130, pp 329 – 335.

41.- Kodamatani H, Yamazaki S, Saitoc K, Tomiyasua T, Komatsu Y. Selective determination method for measurement of nitrite and nitrate in water samples using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, **2009**; vol. 1216, pp 3163–3167.