



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de las variables implicadas en la extracción de alquilfenoles en algas mediante agua sobrecalentada (PHWE)

Estudo das variables implicadas na extracción de alquilfenoles en algas mediante auga sobrequeentada (PHWE)

Factor screening study affecting alkylphenol extraction in seaweeds by hot water extraction (PHWE)

Director(es): Jorge Moreda Piñeiro
Isabel Turnes Carou

Borja de la Fuente Ferreiro

Curso: 2014/2015 – Convocatoria: Septiembre

ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Introducción.....	3
2.1	Alquifenoles y bisfenol A.....	3
2.2	Características generales de las algas	9
2.3	Extracción con agua sobrecalentada a presión (PHWE)	10
2.4	Extracción asistida por membranas	12
2.5	Diseño de experiencias Plackett-Burman	13
2.6	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectroscopia de masas en tándem (HPLC-MS/MS)	14
3	Objetivos.....	19
4	Procedimiento Experimental	21
4.1	Instrumentación	21
4.2	Reactivos.....	21
4.3	Material.....	22
4.4	Muestra	22
4.5	Procedimiento	22
4.5.1	Pretratamiento de la muestra	23
4.5.2	Diseño de experiencias Plackett-Burman	24
4.5.3	Extracción por PHWE	27
4.5.4	Extracción por MASE	27
4.5.5	Análisis de APs y BPA por HPLC-MS/MS	27
5	Resultados.....	33
6	Conclusión.....	37
7	Bibliografía.....	41

Índice de figuras

Figura 1: Esquema básico de un equipo ASE (www.chromatographyonline.com)	11
Figura 2: Sistema de extracción asistida por membrana	13
Figura 3: Esquema básico de un sistema de HPLC (www.chemguide.co.uk)	15
Figura 4: Diagrama de un espectrómetro de masas (www.lamondlab.com).....	15
Figura 5: Cilindros con bolas de circonio y muestra de alga a estudiar	23
Figura 6: Molino de bolas de circonio.....	23
Figura 7: Calibrado de 4-tOP	29
Figura 8: Calibrado de 4-OP.....	29
Figura 9: Calibrado de 4-n-NP	30
Figura 10: Calibrado de NP.....	30
Figura 11: Carta Pareto de la mezcla de isómeros de nonilfenol	34
Figura 12: Carta Pareto de 4-n-nonilfenol.....	34

Índice de tablas

Tabla 1: Diferentes métodos de síntesis industrial de nonilfenol y alquilfenol.	4
Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de los alquilfenoles más utilizados	5
Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas del BPA	6
Tabla 4: Concentración media y concentración máxima admisible de nonilfenol y nonilfenol en aguas superficiales.....	7
Tabla 5: Estructura y peso molecular de los compuestos a estudiar	8
Tabla 6: Variables estudiadas en la extracción.....	25
Tabla 7: Experiencias a realizar según el diseño Plackett-Burman.....	26
Tabla 8: Gradiente de elución de la fase móvil en HPLC	27
Tabla 9: Condiciones del espectrómetro de masas	28
Tabla 10: Resultados obtenidos de concentración de alquilfenoles en alga.....	33

1 RESUMEN

Resumen

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la extracción de algunos de los alquilfenoles más comercializados (4-octilfenol, 4-terc-octilfenol y nonilfenol) y bisfenol A mediante agua a presión sobrecalentada (PHWE) en algas marinas comestibles comerciales y su posterior análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). Se ha utilizado un diseño de experiencias Plackett-Burman para averiguar las variables que afectan de forma más significativa a la extracción. Se estudiarán como posibles variables la temperatura, presión, tiempo y ciclos de extracción, ratio dispersante(C18)-muestra, concentración de modificador (MeOH) y tiempo de purga. La importancia de cada variable se verá representada mediante cartas Pareto de primer orden. Según los resultados obtenidos, excepto la presión, todas las demás variables han resultado significativas.

Resumo

O obxectivo do presente traballo é a estudo da extracción dalguns dos alquilfenois máis comercializados (4-octilfenol, 4-terc-octilfenol e nonilfenol) e bisfenol A mediante auga a presión sobrequeada (PHWE) en algas mariñas comestibles comerciais e o seu posterior análise das mediante unha cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas (HPLC-MS/MS). Utilizouse un deseño de experiencias Plackett-Burman para averiguar as variables que afectan de forma máis significativa á extracción. Estudaránse como posibles variables a temperatura, presión, tempo e ciclos de extracción, ratio dispersante(C18)-mostra, concentración de modificador (MeOH) e tempo de purga. A importancia de cada variable verase representada mediante cartas Pareto de primer orde.. Según os resultados obtidos, excepto a presión, todas as demais variables resultaron significativas.

Summary

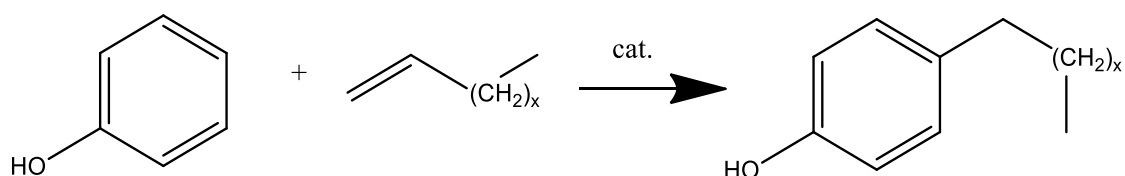
The aim of this study is to analyze the extraction of some of the most commercialized alkyphenolic compounds (4-octylphenol, 4-terc-octylphenol and nonylphenol) and bisphenol A by pressurized hot water extraction (PHWE) on commercial edible seaweed and the analysis was performed using a high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. A Plackett-Burman experimental design was used to find the significant variables involved in the extraction. The potentially significant variables are temperature, pressure, time, extraction time and cycles, dispersant(C18)-sample ratio, modifier concentration (MeOH) and purge time. The importance of each variable will be studied by first order Pareto charts. The results show that, except pressure, every variable is significant.

2 INTRODUCCIÓN

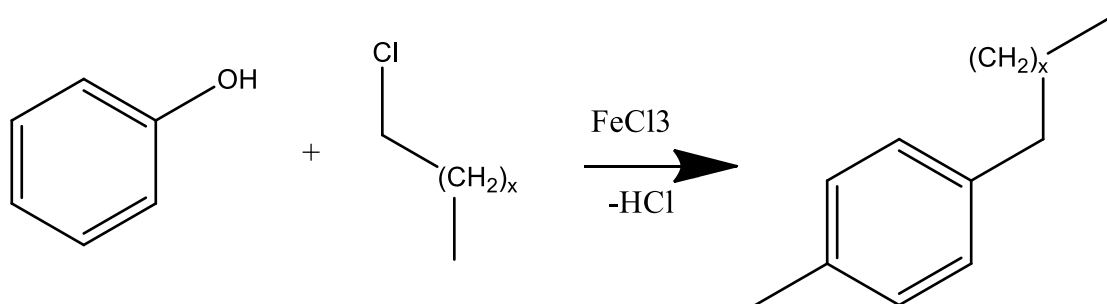
2.1 ALQUILFENOLES Y BISFENOL A

Los alquifenoles (APs) son compuestos derivados del fenol con una o más cadenas hidrocarbonadas conectadas al anillo aromático. La longitud de las cadenas varía entre 1 y 12 carbonos y normalmente están dispuestas en la posición “para” del fenol. El gran número de ramificaciones posibles en la cadena hace que existan gran cantidad de isómeros, lo que hace que la familia de los alquifenoles alcance aproximadamente 130 estructuras diferentes. Los más utilizados industrialmente son los octil, nonil, decil, dibutil y dodecilfenoles.

Actualmente la síntesis de alquifenoles más extendida de forma industrial se realiza a partir de un fenol y el alqueno deseado en presencia de un catalizador:



Aunque la forma más extendida antiguamente era a partir del derivado halogenado del alcano, pero ha caído en desuso:



En la siguiente tabla se expresan los reactivos, condiciones y catalizadores usados en diferentes síntesis industriales de nonilfenol y octilfenol (Tabla 1):

Tabla 1: Diferentes métodos de síntesis industrial de nonilfenol y alquilfenol.

Reactivos		Temp. (C)	Catalizador	Producto	Rend. %
Fenol	Dinonil	160-170	Arcilla activada	Nonilfenol	45
Fenol	Propileno	45	BF ₃	Nonilfenol	89
Fenol	Noneno	70	BF ₃ .Me ₂ O	Nonilfenol	98
Fenol	Isobuteno	90	ZnCl ₂	Nonilfenol	88
Fenol	1-noneno	100	Ac. 4-toluensulfónico	Nonilfenol	82
Fenol	Octeno	70	BF ₃ .Me ₂ O	Octilfenol	92.5
Fenol	Diisobuteno	70	BF ₃ .Me ₂ O	Octilfenol	94
Fenol	diisobutano	160	Montmorillonita	Octilfenol	98

Estos compuestos se utilizan como intermedios sintéticos en la producción de resinas epoxi, tensioactivos no iónicos, lubricantes y como aditivos para diferentes tipos de polímeros [Groshart, C.P. y cols. 2001]. La demanda de alquilfenoles ascendía a 400.000 ton/año en el 2001, siendo el 80-90% nonilfenol.

Los alquilfenoles presentan varias características comunes entre ellos: baja presión de vapor (<10Pa), baja solubilidad en agua (<15 mg L⁻¹) y carácter lipofílico acusado (log Kow=4-5). En la siguiente tabla se exponen otras propiedades específicas para los alquilfenoles más utilizados:

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de los alquilfenoles más utilizados.

Compuesto	Octilfenol (4-nOP)	4-tert-octilfenol (4-tOP)	n-nonilfenol (4-n-NP)	Nonilfenol (NP) (ramificado)
Fórmula	C ₁₄ H ₂₂ O	C ₁₄ H ₂₂ O	C ₁₄ H ₂₄ O	C ₁₄ H ₂₄ O
N° CAS	67554-50-1	99561-03-2	25154-52-3	84852-15-3
Masa molecular	206.33	206.33	220	220
Punto de fusión (°C)	79-82	79-82	-8	(-8)-10
Punto de ebullición (°C)	277	-	306.7	325.3
Presión de vapor (Pa, 20°C)	1	-	10	10
Densidad (g cm ⁻³ , 20°C)	0.95	-	0.926	0.931
Solubilidad H ₂ O (mg L ⁻¹ , 20°C)	12.6	7	5	5
Log K _{ow}	3.7-4.5	5.56	5.76	3.3-4.5
Log K _{oc}	5.18	4.30	5.39	5.57
Cte. de Henry	6.5*10 ⁻⁵	8.0*10 ⁻⁶	1.5+10 ⁻⁵	3.0*10 ⁻⁵

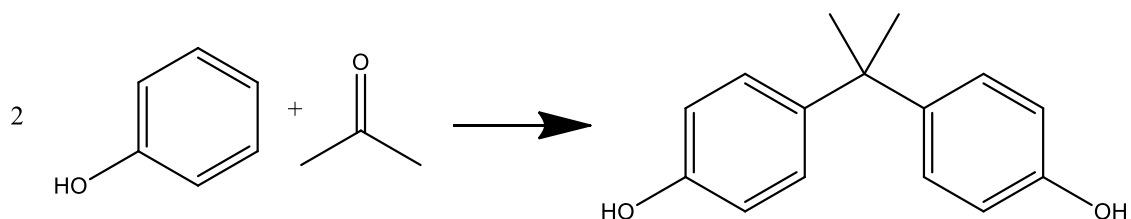
A partir de estas propiedades se puede predecir el comportamiento que adoptarán estos alquilfenoles en el medio. Debido a las características de los vertidos de estos compuestos, como regla general se encontraran en ecosistemas acuáticos, aunque también se encuentran en suelos y en biota. También en aire y polvo suspendido en interiores, debido a impurezas o degradación de alquilfenoles etoxilados, presentes en detergentes y productos de higiene personal [Rudel, R.A. y cols. 2003], aunque en mucha menor concentración, debido a su baja volatilidad. En el medio acuático tiende a adsorberse en los tejidos de los organismos presentes (elevado K_{ow}), así como en lodos, suelos y partículas en suspensión (elevado log K_{oc}). Además, parte de estos compuestos pueden filtrarse a acuíferos subterráneos, aunque se observa una reducción de la concentración importante al aumentar la profundidad [Ahel, M. y cols. 1994].

La degradación de los alquilfenoles en el agua se produce principalmente por vías biológicas y en menor medida, por vía fotoquímica en aguas superficiales. Apenas presentan degradación por hidrólisis. Los tiempos de vida media del nonilfenol varían entre 15-20 días en agua dulce y 50-70 días en medios marinos en presencia de microorganismos adaptados. El periodo de adaptación de lo microorganismos del medio tarda entre 20-30 días.

Las fuentes principales de emisión al medio son en aguas residuales domésticas e industriales, principalmente de derivados de productos de limpieza. En las plantas de tratamiento de agua se eliminan aproximadamente el 90% de los alquilfenoles etoxilados, sin embargo, una parte de ellos se convierten en alquilfenoles, que se emiten al medio.

El bisfenol A (BPA) (2,2-(4,4-dihidroxidifenol)) está formado por dos fenoles unidos a un propano en su carbono central. No son compuestos que existan de forma natural en el medio, si no que se utilizan como intermedios en distintos procesos industriales, como en producción de tensioactivos, retardantes de llama, detergentes... También se usa como monómero principal en la síntesis de policarbonato y algunas resinas epoxi. Se producen anualmente en el mundo aproximadamente 2.200.000 toneladas de BPA (2009).

La síntesis industrial de BPA se lleva a cabo mediante la condensación de fenol en acetona en condiciones de pH bajo y temperaturas altas en resinas de intercambio iónico:



Presenta unas propiedades fisicoquímicas muy similares a los alquilfenoles:

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas del BPA

Nº CAS	80-05-7
Masa molecular	228
Punto de fusión (°C)	155
Punto de ebullición (°C)	398
Presión de vapor (Pa, 20°C)	$5 \cdot 10^{-6}$
Densidad (g cm ⁻³ , 20°C)	1.195
Solubilidad H ₂ O (mg L ⁻¹ , 20°C)	12.6
Log K _{ow}	3.40
Log K _{oc}	3.18
Cte. de Henry	$4.1 \cdot 10^{-9}$

Análogamente a los APs, el BPA puede adsorberse en suelos, sólidos en suspensión y biota, y es susceptible a biodegradación y, en menor medida, a fotólisis. Son poco volátiles y poco solubles en agua. El tiempo de vida media en agua con microorganismos adaptados es de 2.5-4 días y el tiempo de adaptación es de aproximadamente 14 días.

Las principales fuentes de emisión de BPA son a partir de emisiones industriales permitidas, en emisiones fugitivas durante la manufactura o uso de BPA o a partir de productos que contengan BPA sin reaccionar [Staples, C.A. y cols. 1998].

2.2 TOXICIDAD

El BPA y algunos APs actúan como disruptores endocrinos o xenoestrógenos en organismos vivos.

Muchos contaminantes actúan en los organismos como disruptores endocrinos, ya que se unen a los receptores hormonales de los seres vivos provocando distintos efectos no deseados. Muchos de estos compuestos provocan alteraciones, tanto en el individuo como en un ecosistema aun en concentraciones muy reducidas en el medio (10^{-9} – 10^{-12} g g⁻¹) [Connell, D. y cols. 1999].

Los disruptores pueden actuar de varias maneras, ya sea inhibiendo la producción o descomposición de cierta proteína, reduciendo su actividad o uniéndose a receptores hormonales. Los disruptores agonistas se unen a un receptor, simulando una hormona natural y provocando una respuesta biológica que no se produciría de forma natural. Los disruptores antagonistas se unen a un receptor e impiden que interactúe tanto con su molécula asociada como con otras moléculas agonistas, inhibiendo sus posibles repuestas biológicas. También pueden provocar un aumento o disminución en la concentración de determinadas hormonas en el cuerpo. Todo ello provoca gran cantidad de efectos nocivos como inhibición del crecimiento, reducción de la fertilidad, desmasculinización, desfeminización, alteraciones en el sistema inmune y variaciones en el comportamiento dependiendo de la especie afectada.

El NP, 4-nOP, y el BPA así como ciertos derivados, actúan como disruptores agonistas, uniéndose al receptor del estrógeno, provocando efectos tales como la síntesis de vitelogenina en truchas (proteína responsable de producir la yema en lo huevos) o el aumento de la cantidad de células relacionadas con el cáncer de pecho. El xenoestrógeno más potente de ellos es el octilfenol, sin embargo, la concentración necesaria para producir una respuesta biológica sería del orden de 1000 veces la del estrógeno [Crisp, T.M. y cols.1998].

La directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo regula las sustancias consideradas contaminantes prioritarias en aguas superficiales. Según este decreto, la concentración media anual (MA) y la concentración máxima admitida (CMA) de OP y NP son (Tabla 4):

Tabla 4: Concentración media y concentración máxima admisible de nonilfenol y nonilfenol en aguas superficiales

	MA ($\mu\text{g g}^{-1}$)		CMA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Aguas superficiales continentales	Aguas superficiales no continentales	Aguas superficiales continentales	Aguas superficiales no continentales
Nonilfenol	0.3	0.3	0.2	0.2
Octilfenol	0.1	0.01	No aplicable	No aplicable

Según la directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, en el nonilfenol se incluyen los isómeros 4-n-NP y NP ramificado y en el octilfenol, el 4-n-OP y el OP ramificado.

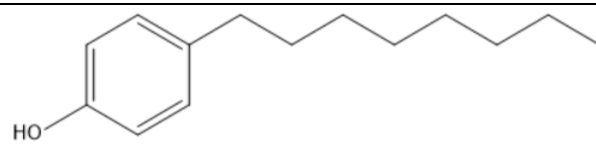
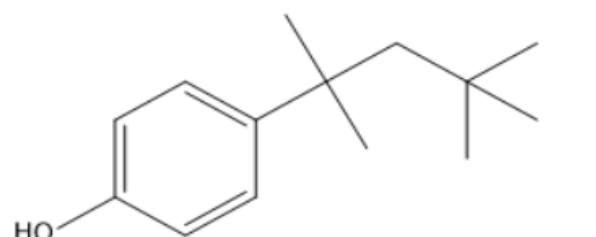
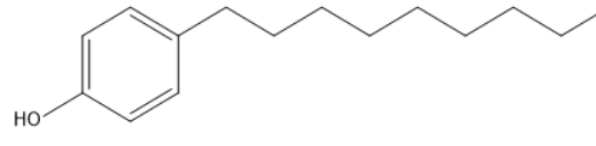
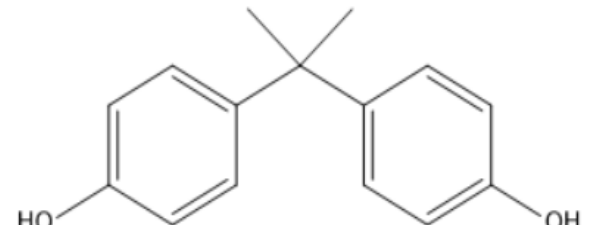
Según la directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo, el BPA está en la lista de sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias.

No existe legislación en lo referente a algas de consumo, sin embargo, se ha evidenciado su presencia en ecosistemas marinos y su capacidad de bioacumulación en distintos organismos, por lo que es necesario su monitorización.

En este trabajo se estudiarán: Bisfenol-A, n-octilfenol, 4-octilfenol, n-nonilfenol y una mezcla de distintos isómeros de nonilfenol.

A continuación en la tabla 5 se representan las distintas estructuras de los compuestos estudiados:

Tabla 5: Estructura de los compuestos a estudiar

Compuesto	Estructura
Octilfenol	
4-n-octilfenol	
n-nonilfenol	
Bisfenol A	

2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ALGAS

El análisis de la biota es muy importante en los estudios de contaminación de los ecosistemas marinos. Los peces, bivalvos, algas y otros organismos acuáticos pueden actuar como bioindicadores de los niveles de contaminantes presentes en el agua.

Las algas son un grupo muy variado de organismos unicelulares o pluricelulares eucariotas y fotoautótrofos que se encuentran principalmente en aguas oceánicas, aunque pueden encontrarse en tierra, en zonas suficientemente húmedas. Aunque pertenecen al reino de las plantas, carecen de raíces, tallo u hojas, a diferencia de las plantas terrestres. Existen varias familias de algas: algas verdes, pardas, rojas, diatomeas, dinoflageladas y hongos acuáticos.

Son parte importante de todos los ecosistemas marinos, ya que componen el escalón más básico de la cadena trófica, lo que significa que todo el contaminante que acumulen pueden pasar fácilmente a otras especies. Además, son la principal fuente de oxígeno disuelto en el agua.

En muchos países orientales se han utilizado como alimento y como medicina natural durante cientos de años, sin embargo, se comenzaron a utilizar en la industria japonesa en el siglo XVII, donde se incineraban algas pardas deshidratadas para extraer sosa cáustica e hidróxido de potasio de sus cenizas. Posteriormente comenzaron a extraerse otros productos importantes como yodo o ficocoloides como el agar, el carragenano o el alginato.

En la actualidad, además de usarse como alimento en casi todo el mundo, tienen gran variedad de aplicaciones, como la producción de cosméticos, fertilizantes, medicamentos y agentes emulsificantes, estabilizantes o espesantes. Además se está desarrollando su uso como fuente de energía, ya que son los organismos que más biomasa pueden producir por unidad de tiempo, lo que las hace interesantes como alternativa a los combustibles fósiles actuales.

En Galicia se usaban de forma tradicional en agricultura como fertilizante. También se usan para la extracción de carragenano y productos farmacéuticos, aunque en los últimos años también se usan como alimento, principalmente por influencia de la cocina oriental.

Su uso como bioindicador de contaminación en medios marinos también ha sido ampliamente estudiado gracias a su capacidad de asimilar contaminantes del medio.

La lechuga de mar (*Ulva rígida*) pertenece a la categoría de las algas verdes foliáceas. Está presente en todos los mares cálidos y templados del mundo y presenta gran resistencia a cambios fisicoquímicos del medio. Tiene forma de láminas de dos células de grosor de color verde intenso unidas, generalmente a rocas o construcciones portuarias. Se usa en varias culturas como alimento y como aditivo a productos cosméticos. En aguas tranquilas y ricas en fósforo y nitrógeno puede provocarse una proliferación masiva de estas algas, fenómeno denominado “marea verde”. Generalmente esta provocado por vertidos de origen agrícola y urbano, que aumenta en gran medida la concentración de estos nutrientes en el medio.

2.4 EXTRACCIÓN CON AGUA SOBRECALENTADA A PRESIÓN (PHWE)

El aumento de los contaminantes emergentes que se vierten al medio requiere unos métodos de monitorización ambiental rápidos, sensibles y eficientes. Sin embargo muchos métodos consumen mucho tiempo y reactivos que, a su vez, son potencialmente peligrosos para el medio.

La química verde es una forma de enfocar la síntesis y tratamiento de sustancias con el objetivo de infligir el mínimo impacto en el medio. Se basa en los siguientes principios

- 1. Evitar los residuos siempre será mejor que tener que tratarlos o eliminarlos luego.
- 2. El producto acabado en los diseños de síntesis ha de incorporar el máximo posible de materiales utilizados durante el proceso.
- 3. Minimizar la toxicidad en el diseño de los métodos sintéticos debe ser una prioridad. Idealmente no ha de tener ninguna, y en la práctica siempre ha de minimizarse en la medida de lo posible.
- 4. Preservar la eficacia ha de ser compatible con reducir o eliminar la toxicidad.
- 5. Uso mínimo de sustancias auxiliares (disolventes, adsorbentes, etc.), siempre optando por las más inocuas.
- 6. Aplicar procesos a presión y temperatura ambiental con preferencia para lograr la eficiencia energética.
- 7. Los materiales renovables siempre serán prioritarios.
- 8. Evitar derivaciones cuando sea posible, como los grupos de bloqueo o, por ejemplo, los pasos de protección y desprotección.
- 9. Sustituir los reactivos estequiométricos por reactivos catalíticos siempre que se pueda.
- 10. Diseñar los productos de modo que resulten biodegradables.
- 11. Vigilar el proceso para evitar que se formen sustancias peligrosas.
- 12. Reducir el riesgo de accidente también mediante la selección de los procesos y las sustancias.

El método de extracción mediante PHWE permite la extracción de contaminantes en matrices sólidas como suelos, sedimentos, alimentos o muestras biológicas utilizando únicamente agua destilada como disolvente, lo que evita el uso de otros disolventes propios de métodos de extracción líquido-líquido.

Muchos de los analitos presentes en este tipo de muestras son difíciles de extraer con agua debido a su baja solubilidad, ya que se trata de moléculas orgánicas apolares. Sin embargo al calentar el agua a temperaturas elevadas pierde paulatinamente su carácter polar, hasta

alcanzar una constante dieléctrica similar a la del etanol, permitiendo la extracción de analitos de polaridad media-baja. Las temperaturas de trabajo están en el rango de 100 a 374 °C, por ello es necesario la aplicación de presiones elevadas para evitar su evaporación, normalmente en el rango de 1500-2000 psi.

En este trabajo para la realización de la extracción PHWE se ha utilizado un equipo de extracción acelerada con disolventes (ASE), representado en la Figura 1. El equipo consta de:

- Varios reservorios de distintos disolventes.
- Un horno para calentar el disolvente.
- Una bomba encargada de transportar el disolvente a presión por el equipo.
- Gas de purga.
- Celdas de extracción.
- Viales de recolección
- Sensores de presión.

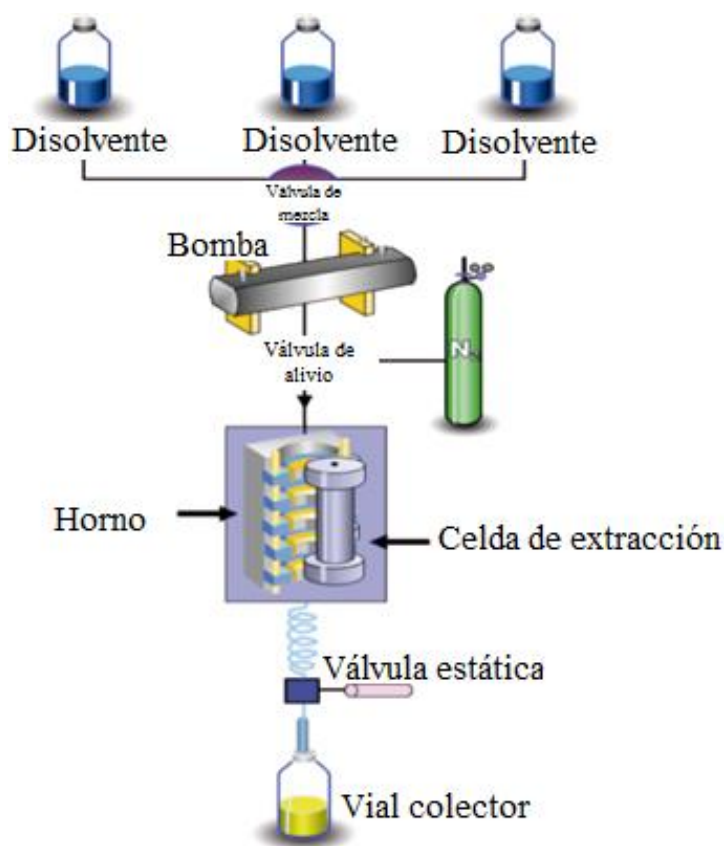


Figura 1: Esquema básico de un equipo ASE (www.chromatographyonline.com)

Durante la extracción se bombea el disolvente o mezcla de disolventes seleccionados hacia la celda de extracción, con la presión deseada. La celda se encuentra alojada en el horno, a la temperatura seleccionada, donde se realiza la extracción de los analitos. Una vez transcurre el tiempo de extracción el disolvente se transporta al vial de recolección y

se hace pasar un gas de purga por el sistema para arrastrar el disolvente que permanezca adsorbido en la celda. Generalmente se utiliza nitrógeno como gas de purga. La elección de las variables viene determinada generalmente por experiencias previas, fuentes bibliográficas y limitaciones de los equipos

Este método presenta otras ventajas, además de evitar el uso de disolventes orgánicos antes mencionado. El equipo está totalmente automatizado y permite programar hasta 26 extracciones, los tiempos de extracción suelen estar entre los 5 y 20 min, es fácil de usar y es muy reproducible. Además, aunque requiere altas temperaturas, la aplicación de presiones elevadas hace que se pueda utilizar con analitos termolábiles. Las principales desventajas radican en el elevado coste del equipo, el tiempo necesario para la preparación de las celdas y la baja selectividad de la extracción, lo que hace necesaria una etapa de purificación del extracto. El método de purificación que se usará es una extracción asistida por membranas.

2.5 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MEMBRANAS

La extracción asistida por membranas (MASE) se basa en el transporte del analito de una fase acuosa a una fase orgánica a través de una membrana que permite el paso de los analitos sin que los disolventes entren en contacto. Los analitos deben ser mucho más solubles en la fase orgánica que en la acuosa para que la extracción tenga éxito. En este tipo de membranas, los analitos se disuelven primero en el material de la membrana para luego pasar al disolvente.

Se utilizan membranas de polipropileno, de 4 cm de largo, con un diámetro interno de 6 mm y un grosor de 0,03mm [Salgueiro N. y cols, 2013].

A la membrana se le incorpora un embudo metálico y se introduce en un vial con la disolución acuosa, de forma que no entre agua en la membrana. Posteriormente se añade el disolvente orgánico deseado, se coloca una tapa metálica para evitar la volatilización de los analitos y se deja en agitación para mejorar la eficacia de la extracción.

La mayor ventaja que ofrece el sistema es que se requiere muy poca cantidad de disolvente (400-1000 μL) y evita la aparición de trazas de agua en el extracto orgánico. Sin embargo, en ausencia de un equipo especializado, tanto la preparación de las membranas como la posterior recolección del extracto son procesos que consumen gran cantidad de tiempo.



Figura 2: Sistema de extracción asistida por membrana

2.6 DISEÑO DE EXPERIENCIAS PLACKETT-BURMAN

Los diseños de experiencias permiten estudiar la importancia de distintas variables independientes reduciendo la cantidad de experimentos necesarios sin perder la precisión estadística de los resultados. Se basa en realizar un proceso varias veces con las variables que se deseen estudiar oscilando entre un valor máximo y mínimo previamente fijados.

A diferencia de los métodos univariantes los diseños e experiencias permiten el estudio de varias variables y su interacción entre ellas.

En los diseños de experiencias Plackett-Burman se realizan $4n$ (siendo n un número entero) experiencias para mantener la ortogonalidad. Se crea una matriz donde la primera fila se desplaza $4n-2$ veces hasta completar la matriz.

Las experiencias realizadas reciben un tratamiento estadístico que permite obtener las cartas Pareto para el proceso. En él, la longitud de las barras representa la influencia que tiene la variable en cuestión ya sea positiva o negativa. Aquellas barras que superan un valor determinado son consideradas estadísticamente significativas. Normalmente se fija con respecto a un valor de t_{critico} del 95% de confianza.

2.7 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASAS EN TÁNDEM (HPLC-MS/MS)

Esta técnica analítica se basa en la separación de los componentes de una mezcla compleja en HPLC para su posterior determinación en un espectrómetro de masas. La separación en el HPLC se lleva a cabo al hacer pasar una disolución a presión conteniendo la muestra a estudiar por una columna rellena de una fase estacionaria adecuada. La principal diferencia con una cromatografía en columna tradicional es que la fase móvil se hace pasar por el sistema a grandes presiones, lo que permite el uso de adsorbentes con tamaños de partícula menores, mejorando la separación. Además, los equipos de HPLC están completamente automatizados.

Las diferentes interacciones de los compuestos con el material alojado en la columna provocan que eluyan a diferentes tiempos, alcanzando una separación basada en la interacción de los analitos con las fases presentes en el sistema. Constan de una fase móvil, que suele ser un disolvente donde se introduce la muestra líquida, y una fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida, contenida dentro de la columna cromatografía.

La composición de las fases móvil y estacionaria depende de la modalidad de análisis que se vaya a efectuar:

-En HPLC en fase normal la fase estacionaria es un adsorbente polar, generalmente sílice, y la fase móvil es un disolvente apolar, como hexano. Los analitos polares disueltos en la fase móvil quedarán más retenidos en la fase estacionaria polar, mientras que los compuestos apolares saldrán antes.

-En HPLC en fase reversa la fase estacionaria de sílice se modifica añadiendo cadenas hidrocarbonadas de longitudes variables entre los 8 y 18 unidades de $-CH_2-$ provocando que el adsorbente tenga carácter apolar. La fase móvil a su vez pasa a ser un disolvente polar, como agua o mezclas de agua con algún disolvente orgánico, como acetonitrilo o metanol. En este caso ocurrirá lo contrario a la fase normal. Los analitos apolares quedarán fuertemente atraídos por las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, aumentando su tiempo de retención, mientras que los analitos polares saldrán antes de la columna.

El HPLC de fase reversa es el más utilizado en cromatografía, y es el que se usará para la detección de los APs y BPA en este trabajo, dado su carácter apolar.

A continuación se representa un esquema básico de un sistema de HPLC (figura 3). En este caso en lugar del detector, estará acoplado a un espectrómetro de masas.

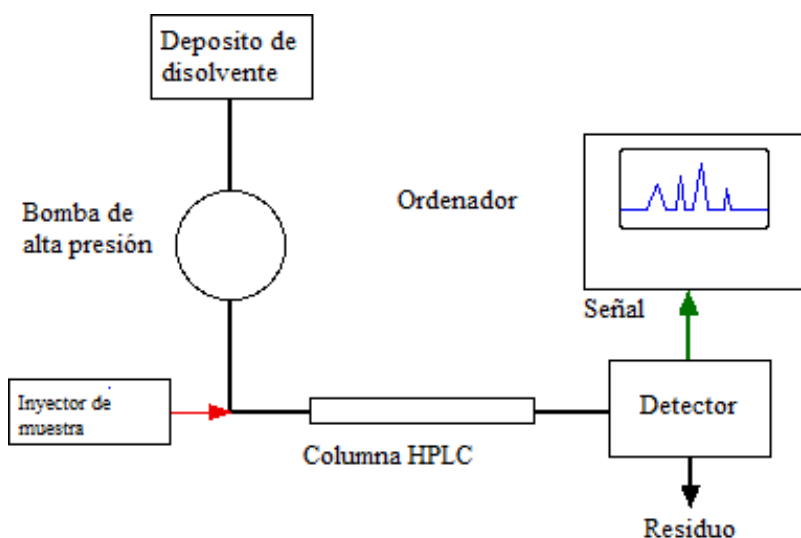


Figura 3: Esquema básico de un sistema de HPLC (www.chemguide.co.uk)

La espectroscopia de masas se basa en la selección de analitos en función de su relación carga-masa. Las muestras se hacen pasar por una fuente de ionización, donde se elimina la fase móvil, por un analizador de masas, donde se separan los iones del analito y un detector que proporciona la señal analítica. A continuación se representa un esquema básico de un espectrómetro de masas:

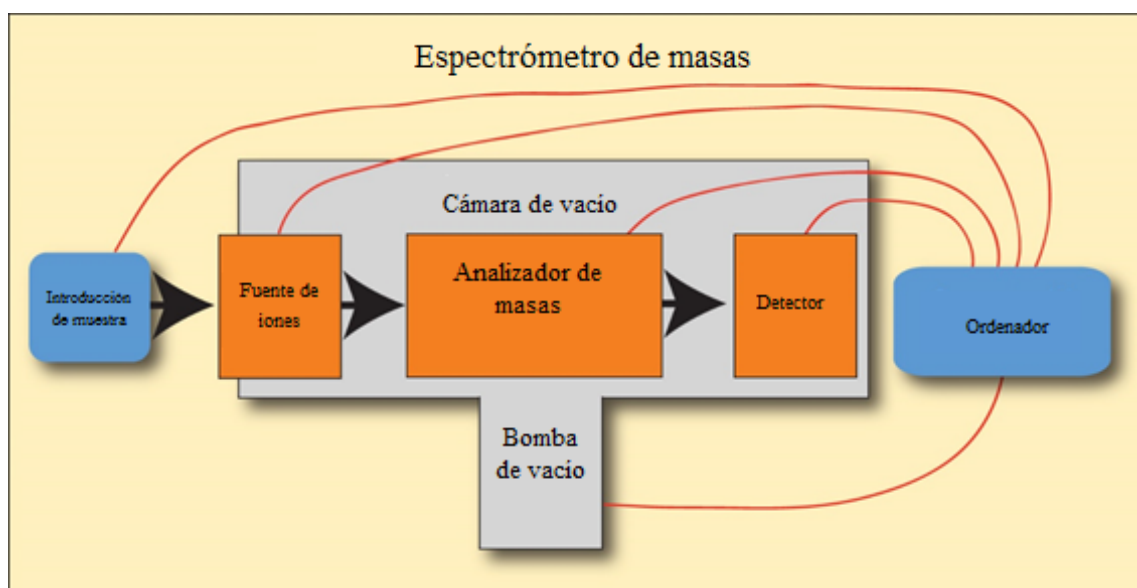


Figura 4: Diagrama de un espectrómetro de masas (www.lamondlab.com)

Las principales fuentes de ionización capaces de eliminar la fase móvil antes de entrar en el analizador son: el bombardeo de átomos a gran velocidad (FAB), la ionización por termonebulización (TS), desorción de la matriz asistida por láser (MALDI) e ionización a presión atmosférica (API).

La ionización a presión atmosférica es un método que permite la ionización de gran cantidad de moléculas de bajo peso molecular sin provocar demasiadas fragmentaciones en su estructura, evitando espectros con demasiados picos. La principal desventaja es que no consigue eliminar el efecto matriz lo que reduce la reproducibilidad de los resultados.

Los métodos de ionización a presión atmosférica se dividen según la forma de realizarse la ionización: por ionización química (APCI), fotoionización (APPI), o ionización con electrospray (ESI).

La técnica ESI se basa en la aplicación de un campo eléctrico, formando un aerosol que finalmente dará lugar a la evaporación del disolvente al aplicar temperaturas elevadas y nitrógeno gas. Todo esto provoca la ionización de los analitos, que pasan al analizador de masas.

La disolución con el analito se hace pasar por una aguja de vidrio desde la que se le aplica un potencial de 3-4 kV. La disolución es nebulizada desde la punta de la aguja, formando un cono (cono de Taylor). Asume esta forma ya que permite la retención de carga de forma más efectiva. Las cargas presentes en el cono, al tener el mismo signo, se repelen entre sí, provocando su dispersión y reducción en tamaño. El proceso continua hasta la total volatilización del disolvente, obteniendo así las moléculas del analito cargadas.

Las principales ventajas de esta técnica son que es una técnica suave, que no descompone compuestos lábiles, presenta una buena sensibilidad y aplicabilidad y es válida para compuesto de elevado peso molecular y de polaridad media-baja. Sin embargo las mezclas complejas, con contenido en sales o impurezas reducen mucho la sensibilidad del método, además que presenta cierto efecto memoria.

Uno de los analizadores de masas más utilizados es el cuadrupolo lineal. Consta de cuatro rodillos circulares a los que se les aplican campos eléctricos y magnéticos. Esto provoca que los analitos ionizados, al entrar en el analizador comiencen a oscilar, provocando la colisión de todos aquellos que no cumplan la relación m/z adecuada.

Para mejorar la resolución y selectividad del método se utiliza un triple cuadrupolo, que consiste en disponer de forma lineal dos cuadrupolos donde se realiza la separación de los iones entre los que se sitúa otro cuadrupolo donde se hace pasar un gas de colisión que fragmenta los iones para el análisis.

Las condiciones a tener en cuenta en la fuente de ionización serán:

- El potencial aplicado para la ionización: Es el potencial que se debe aplicar en la fase de ionización para eliminar el disolvente y obtener los iones de los analitos. El voltaje varía en función del disolvente utilizado pero será mayor cuanto mayor sea su tensión superficial.
- Porcentaje de modificador de la fase móvil: El modificador es un compuesto añadido en bajas concentraciones a la fase móvil con el objetivo de facilitar la formación de iones de los analitos, mejorando la señal analítica obtenida.
- Temperatura de la fuente de ionización: Temperatura necesaria para la evaporación del disolvente.
- Flujo de gas nebulizador: Se encarga del secado del disolvente y de dirigir los analitos hacia el analizador de masas. El flujo de gas necesario aumenta cuanto mayor fase móvil se utilice. Además facilita la ionización de los analitos.
- Flujo de curtain gas: Es una corriente de gas nitrógeno cuyo objetivo es mantener limpias las líneas que unen la fuente con el sistema de vacío y evitar la formación de clúster durante la ionización. Un flujo excesivo puede provocar pérdidas en la sensibilidad.

- Distancia vertical del capilar a la fuente: Influye en la ionización de los analitos.

Las condiciones del analizador de masas son:

- El ion precursor (Q1M) es el ion no fragmentado del analito producido al perder un protón o un ion deuterio. Su separación se produce en el primer cuadrupolo.
- Los iones producto (Q3M) son iones secundarios obtenidos al fragmentar el ion precursor en la cámara de colisión. Se seleccionan en el tercer cuadrupolo. Los patrones de fragmentación se registran en el detector, y son característicos para cada compuesto, lo que mejora la sensibilidad del método.
- El tiempo de barrido (t) es el intervalo de tiempo que tarda en realizarse el análisis de masas. La definición de los picos aumenta con el tiempo.
- El potencial de declustering (DP) es el potencial aplicado durante el proceso de ionización en la cámara, para eliminar los clúster ion-gas N₂.
- El potencial de entrada (EP) es el potencial aplicado tras el skimmer para que los iones adquieran la energía adecuada para pasar al primer cuadrupolo.
- El potencial de energía de colisión (CEP) es el potencial aplicado entre el primer y segundo cuadrupolo para asegurar el paso de los iones.
- La energía de colisión (CE) es la energía que adquieren las moléculas de gas de colisión que provocan la fragmentación de los iones precursores.
- El potencial de celda exterior (CXP) es el potencial que se aplica para pasar los iones al tercer cuadrupolo.

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método de extracción de alquifenoles (APs) y bisfenol A (BPA) en muestras de alga que esté de acuerdo con los principios de la “química verde”, reduciendo en la medida de lo posible la cantidad de reactivos potencialmente peligrosos para el medio ambiente.

Más concretamente, se ha intentado averiguar qué variables son estadísticamente significativas en un método de extracción por agua sobrecalentada utilizando únicamente agua modificada con pequeñas cantidades de metanol como disolvente.

Las variables que se van a evaluar son: la temperatura de extracción, la presión, el tiempo de extracción, los ciclos de extracción, el ratio dispersante-muestra, la cantidad de modificador y el tiempo de purga. Para realizar el análisis se utiliza un diseño de experiencias Plackett-Burman y se analizan los resultados mediante cartas Pareto de primer orden.

Las concentraciones de APs y BPA se determinan mediante HPLC-MS/MS en unas condiciones previamente optimizadas y que no son objeto de este trabajo.

4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTACIÓN

- Molino de bolas Fritsch Planetary Micro Mill Pulverisette (Fritsch Industries, Idar-Oberstein, Alemania), equipado con cilindros y bolas de circonio.
- Equipo de extracción con disolventes presurizados Dionex ASE-200 (Sunnyvale, CA, EEUU) equipado con celdas de acero inoxidable de 11 mL y filtros de celulosa (D28, 1,983 cm diámetro, Dionex).
- Paquete estadístico Statgraphics Plus V 4.0, para Windows, 1994-1999 (Manugistics, Rockville, MD, EEUU).
- Espectrómetro de masas triple cuadrupolo Applied Biosystems of Life Technologies API3200 (Carlsbad, CA, USA) acoplado a un sistema HPLC Agilent 1200 con bomba binaria, inyector automático, horno de columnas termostatzado e interfase de ionización ESI y APCI de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA)
- Columna Hypersil Gold 150x2,1; 3 μ m partícula, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Viales ámbar de 9 mm
- Membranas de polipropileno 4 cm de largo, 0.03 mm de grosor, embudo metálico, aro de teflón y vial de vidrio 20 mL para MASE de Gerstel (Mülheim, Alemania)
- Agitador Vibrax-VXR de IKA (Staufen, Alemania)
- Purificador de agua Milli-Q purification Millipore Co. (Belford, MA, USA)

4.2 REACTIVOS

- Patrones e de bisfenol A (99%), 4-octilfenol (99%), 4-tert-octilfenol (97%) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- Patrones de 4-n-nonilfenol (99%) y una mezcla técnica de isómeros de nonilfenol (94%) de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania)
- Patrón deuterado de Bisfenol A d16 en acetonitrilo (99,5%) de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania)
- Patrón deuterado de 4-n-nonilfenol 2,3,5,6-d4 (99,3%) de CDN isotopes (Pointe-Claire, Canadá)
- Metanol calidad HPLC, Panreac (Barcelona, España)
- Agua Milli-Q Resistividad específica 18 $M\Omega$ cm^{-1} Millipore Co. (Bedford, MA, USA)
- Octadecyl-functionalized silica gel, C18, 60-100 mesh, (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EEUU)
- Nitrógeno X50S 99,99999% (Carburos Metálicos, Barcelona, España)
- HNO_3 10% v/v para lavado (Philipsburg, PA, USA)

4.3 MATERIAL

- Balanza electrónica AND modelo ER-180A, de precisión $\pm 0,0001$ g.
- Balanza granataria GRAM modelo SV-510ix, de precisión $\pm 0,001$ g.
- Micropipetas Eppendorf de volumen fijo y volumen variable.
- Mortero de ágata.
- Material volumétrico.

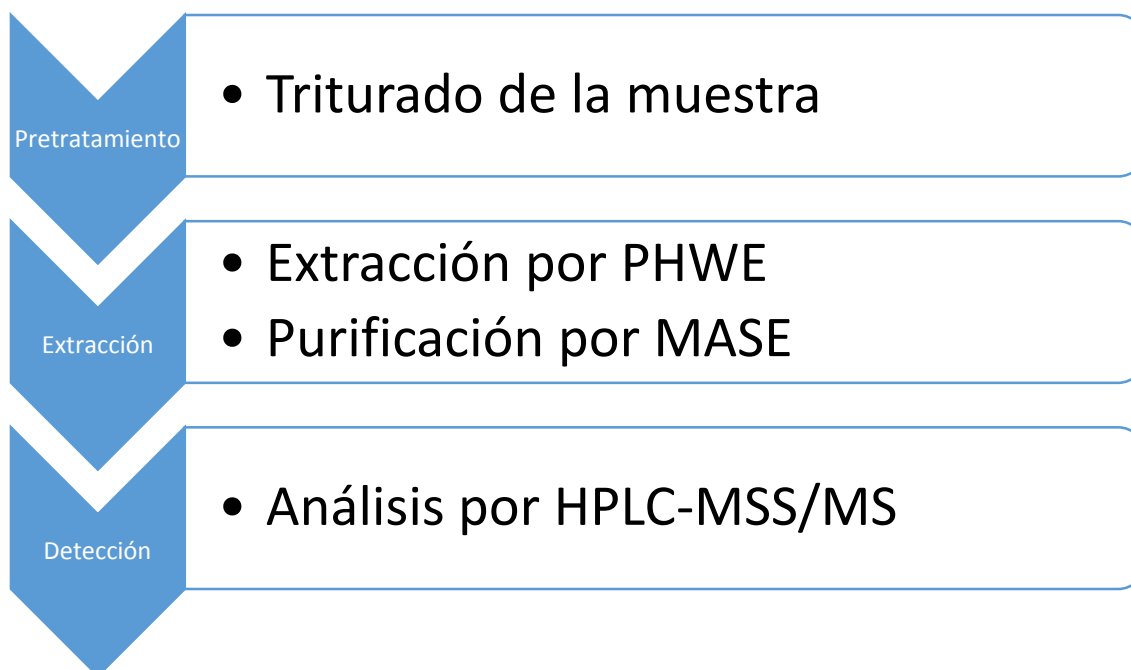
4.4 MUESTRA

- La muestra utilizada es lechuga de mar (*Ulva rigida*) deshidratada. Es un alga comercial destinada al consumo humano.



4.5 PROCEDIMIENTO

El proceso llevado a cabo seguirá el siguiente esquema:



4.5.1 Pretratamiento de la muestra

En primer lugar se tritura la muestra en un molino de bolas de circonio a 1500-2000 rpm durante media hora. Posteriormente se tamiza con un tamiz de malla de 0.50 mm. En las Figuras 5 y 6 se muestra el equipamiento utilizado en esta etapa.



Figura 5: Cilindros con bolas de circonio y muestra de alga a estudiar



Figura 6: Molino de bolas de circonio

4.5.2 Diseño de experiencias Plackett-Burman

Para el estudio de las variables estadísticamente significativas en la extracción se realizó un diseño de experiencias Plackett-Burman con 8 variables: 7 variables reales (temperatura (T), presión (P), tiempo de extracción (te), número de ciclos (Cic), ratio dispersante-muestra (Rt), cantidad de modificador (Mod) y tiempo de purga (tg)) y una variable fantasma adicional, que no implica ningún cambio físico en la muestra y se utiliza para evaluar posibles errores en el proceso. Las variables a estudiar en la extracción son:

-La **temperatura** (T) permite reducir la constante dieléctrica del agua, permitiendo disolver analitos orgánicos, al mismo tiempo que reduce su viscosidad, tensión superficial y aumenta su difusividad. Además provoca la desorción de los analitos de la mayoría de las matrices. Es importante evitar procesos de oxidación, hidrólisis y reacciones no deseadas en solutos termolábiles, que pueden llevar a una reducción significativa de la señal analítica, reduciendo la exactitud del estudio. Se estudiara el rango de 100–200 °C. El rango está determinado por que el equipo alcanza una temperatura máxima de 200 °C.

-La **presión** (P) se utiliza principalmente para evitar que el disolvente pase a estado gaseoso, aunque puede mejorar la penetración del disolvente en la matriz. Se estudiara el rango de 1500–2500 psi. El rango está determinado por que el equipo alcanza una presión máxima de 3000 psi.

-El **tiempo de extracción** (te) influye en la cantidad de analito que se disuelve en el agua, aumentando el rendimiento de la extracción al aumentar el tiempo, hasta que llega a un máximo, cuando el disolvente está saturado. Se estudiara el rango de 5-10 min.

-El **número de ciclos** (Cic) son las veces que se hace circular el disolvente por la celda de extracción. Al realizar más ciclos se aumenta la eficacia de la extracción. Se estudiara el rango de 1-3 ciclos. El equipo permite realizar hasta cinco etapas de extracción.

-El **ratio dispersante/muestra** (Rt) determina la cantidad de dispersante que se le añade a la muestra en la celda de extracción. El dispersante es una sustancia inerte que se mezcla con la muestra con el objetivo de reducir las interacciones del analito con la matriz y disponer la muestra de manera uniforme. El dispersante seleccionado es C18 y para una cantidad de muestra de 0,5 g se estudiara un rango de 1,0-2,5 g de dispersante (ratio de 2-5). La elección del dispersante, así como su cantidad se basa en estudios previos realizados, así como datos extraídos de las fuentes bibliográficas.

-La **cantidad de modificador** (Mod) añadido, que es un disolvente orgánico que se usa para intentar disolver incrementar la solubilidad del analito. En este caso se utilizó metanol, en un rango de 0-10% v/v.

-El **tiempo de purga** (tg) es el tiempo que se hace pasar el gas de purga por el sistema para eliminar el exceso de disolvente de la celda y del equipo. Se estudia el rango de 60-90 min.

-La **variable fantasma o dummy** (D) se utiliza para advertir posibles fallos en el método tales como errores instrumentales o la posible participación en el diseño de variables que no se han tenido en cuenta.

A continuación se muestran las variables a estudiar y sus rangos (Tabla 6) y los experimentos realizados (Tabla 7).

Cada una de las experiencias se realizó por duplicado: dos muestras y un blanco de procedimiento para cada experiencia.

Tabla 6: Variables estudiadas en la extracción

Variable	Clave	Valor bajo	Valor alto
Temperatura/°C	T	100	200
Presión/psi	P	1500	2500
Tiempo de extracción/min	te	5	10
Numero de ciclos	Cic	1	3
Ratio dispersante-muestra	Rt	2	5
Cantidad de modificador/% v/v	Mod	0	10
Tiempo de purga/s	Pg	60	90
Dummy	D	+1	-1

Tabla 7: Experiencias a realizar según el diseño Plackett-Burman

N° de experiencia	Variables							
	T	P	te	Cic	Rt	Mod	pg	D
1	200	1500	10	1	2	0	90	+1
2	200	2500	5	3	2	0	60	+1
3	100	2500	10	1	5	0	60	-1
4	200	1500	10	3	2	10	60	-1
5	200	2500	5	3	5	0	90	-1
6	100	2500	10	1	5	10	60	+1
7	100	2500	10	3	2	10	90	-1
8	100	1500	10	3	5	0	90	+1
9	200	1500	5	3	5	10	60	+1
10	100	1500	5	1	5	10	90	-1
11	100	2500	5	1	2	10	90	+1
12	200	1500	5	1	2	0	60	-1

4.5.3 Extracción por PHWE

Para la preparación de las celdas se homogenizan 0.5 g aproximadamente de alga triturada (previamente humectada con 200 μL de agua Milli-Q) con la cantidad adecuada de dispersante C18 (determinada por el ratio dispersante-muestra), se homogeniza y se introduce en la celda con ayuda de un embudo de acero inoxidable. La preparación de los blancos se realiza de forma análoga a las demás, pero sin añadir la muestra de alga.

Preparadas las celdas se colocan en el equipo ASE con las condiciones determinadas por el diseño de experiencias (Tabla 7) y se comienza la extracción. Una vez terminada, se recoge el extracto en viales de vidrio y se conserva en nevera ($\sim 6^\circ\text{C}$) hasta su purificación.

4.5.4 Extracción por MASE

Los extractos obtenidos con el método de PHWE se enrasan con agua Milli-Q a 50 mL en un matraz aforado. De esta disolución se miden 15 mL en una probeta y se trasvasan a un vial de MASE de 20 mL, al que se le añaden 0.2 mL de una mezcla de patrones deuterados de bisfenol A d16 y 4-n-nonilfenol 2,3,5,6-d4, ambos en concentraciones de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Con unas pinzas se inserta el embudo metálico en la membrana de polipropileno y se fija con un aro de teflón. Se introduce en el vial y se le añaden 500 μL de hexano. Se deja en agitación (~ 200 rpm) durante 1 hora.

Se recoge el contenido de las membranas y se lava con pequeñas porciones de hexano para evitar posibles pérdidas de analito y se trasvasa a un vial de 2 mL.

El disolvente es evaporado a sequedad en corriente de nitrógeno y se redisuelve el residuo en 200 μL de metanol para su análisis en HPLC-MS/MS. Este cambio de disolvente es necesario, ya que el hexano no es compatible con la fase móvil del HPLC.

4.5.5 Análisis de APs y BPA por HPLC-MS/MS

Las condiciones del análisis por HPLC-MS/MS son:

- Fase estacionaria de C18
- Temperatura de la columna de 650°C
- Fase móvil de agua: metanol con el siguiente gradiente de elución (Tabla 8):

Tabla 8: Gradiente de elución de la fase móvil en HPLC

t/min	-7	0	1	5	12	14
% H ₂ O	80	80	80	0	0	80
% MeOH	20	20	20	100	100	20

- Flujo de fase móvil de 0.25 mL min⁻¹
- Volumen de inyección de muestra de 25 µL

La fuente de ionización tendrá los siguientes parámetros:

- Voltaje aplicado para la ionización: -4.500V
- Temperatura de la fuente: 650°C
- Flujo de gas nebulizador: N₂: 35 psi, O₂: 35 psi
- Flujo de curtain gas: 10 psi
- Distancia vertical fuente-capilar: 5mm

Condiciones del análisis de masas se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9: Condiciones del espectrómetro de masas

Comp.	t _R /min	Q1M	Q3M	t	DP	EP	CEP	CE	CXP
BPA	9.40	227	212	75	-40	-9	-16	-24	-4
			133	75	-40	-9	-16	-32	-2
BPA-d16	9.39	241	142	75	-45	-9.5	-38	-44	-4
			221	75	-45	-9.5	-38	-46	-4
4-tOP	10.62	205	133	50	-45	-10.5	-14	-30	-2
			116	50	-45	-10.5	-14	-76	0
NP	10.89	229	133	50	-40	-6	-14	-38	-2
			116	50	-40	-6	-14	-74	-2
4-OP	10.99	205	106	50	-50	-6.5	-14	-26	-2
4-n-NP	11.23	219	106	50	-45	-8.5	-14	-28	0
			119	50	-45	-8.5	-14	-44	-4
NP-d4	11.23	223	109	50	-45	-10.5	-32	-28	-4
			129	50	-45	-10.5	-32	-46	-2

t_R: tiempo de retención.

Q1M: Ion precursor.

Q3M: Iones producto.

T: tiempo de barrido.

DP: Potencial de declustering.

EP: Potencial de entrada.

CEP: Potencial de energía de colisión.

CE: Energía de colisión.

CXP: Potencial de celda exterior.

La cuantificación se realiza utilizando el método de calibración con patrón interno; para ello se construyen rectas de calibrado (con 7 niveles de concentración: 10, 50, 150, 300, 600, 750 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) para 4-tert-octilfenol, 4-n-octilfenol, 4-n-nonilfenol y la mezcla de isómeros de nonilfenol. Como patrón interno se utiliza 4-NP d4. En las gráficas 7-10 se muestran las rectas de calibrado obtenidas. Como puede observarse, se obtiene un rango lineal para todos los compuestos entre 50 y 750 $\mu\text{g L}^{-1}$

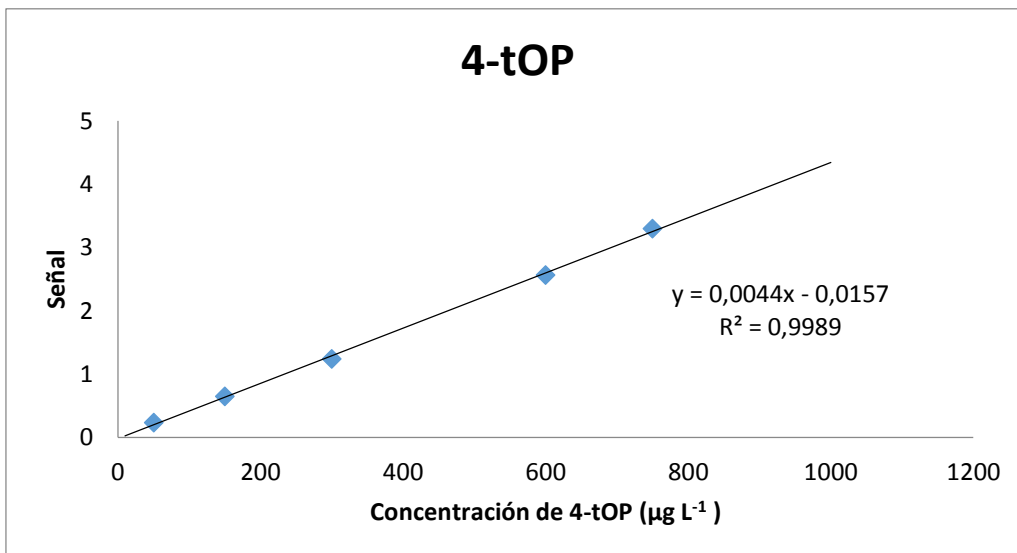


Figura 7: Calibrado de 4-tOP

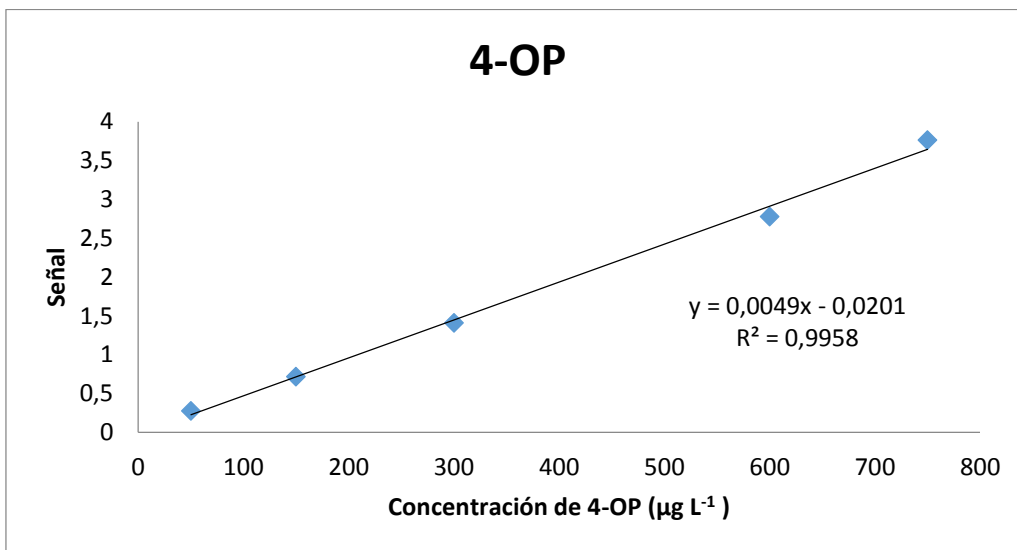


Figura 8: Calibrado de 4-OP

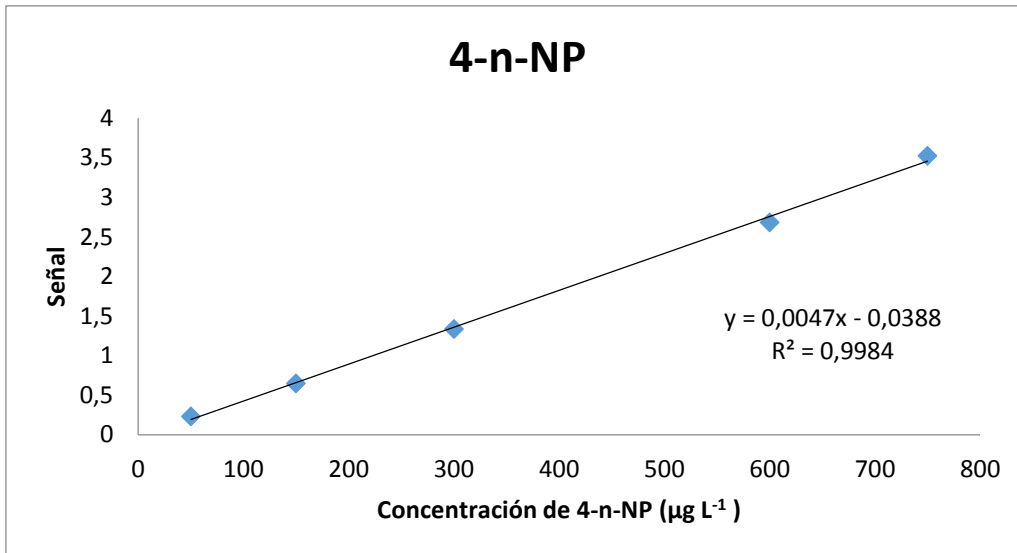


Figura 9: Calibrado de 4-n-NP

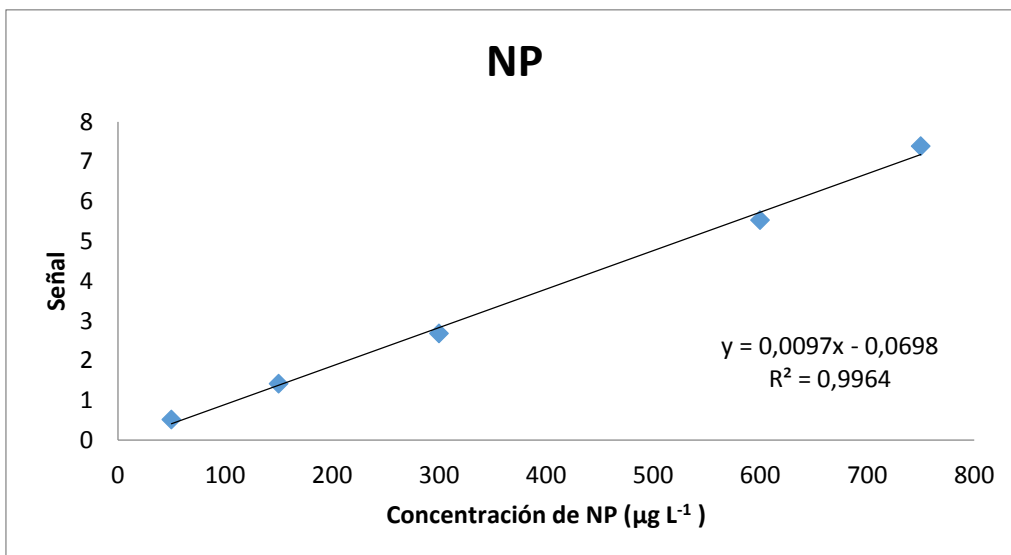


Figura 10: Calibrado de NP

Utilizando las rectas de calibrado se calculan los límites de detección y cuantificación del método.

El límite de detección es el valor mínimo de asociado a un analito que no puede ser confundida con un blanco al 99% de confianza. Puede ser calculado a partir de los valores del blanco de calibrado y su desviación estándar o a partir de los parámetros de la recta a y S_a (Ecuación 1 y 2).

$$LOD = \frac{Y_{Bcal} + 3DE_B}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$LOD = \frac{a + 3S_a}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo Y_{Bcal} el valor del blanco de calibrado, DE_B su desviación estándar, a la ordenada en el origen, S_a el error de la ordenada en el origen y m la pendiente de la recta.

El límite de cuantificación es la concentración mínima de un analito que se puede cuantificar al 99% de confianza. Al igual que el LOD, puede ser calculado a partir de los valores del blanco de calibrado y su desviación estándar o a partir de los parámetros de la recta a y S_a (Ecuación 3 y 4).

$$LOQ = \frac{Y_{Bcal} + 10DE_B}{m} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$LOQ = \frac{a + 10S_a}{m} \quad \text{Ecuación 4}$$

Siendo Y_{Bcal} el valor del blanco de calibrado, DE_B su desviación estándar, a la ordenada en el origen, S_a el error de la ordenada en el origen y m la pendiente de la recta.

En la tabla 10 se muestran los límites de detección y cuantificación de los compuesto incluidos en este estudio en las muestras de alga, teniendo en cuenta todas las etapas del proceso.

Tabla 10: LOD y LOQ de los alquilfenoles en alga

	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
4-tert-octilfenol	0.037	0.14
4-n-octilfenol	0.078	0.28
4-n-nonilfenol	0.038	0.16
Mezcla nonilfenol	0.07	0.27

5 RESULTADOS

Con el objetivo de evaluar las variables que afectan a la extracción de alquilfenoles en algas con agua sobrecalentada, se realiza el análisis del diseño de experiencias (Tabla 7) y los resultados obtenidos (Tabla 11) se estudian con ayuda de las cartas Pareto de primer. Este tipo de análisis se realiza con el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0 y se basa en el estudio de la varianza de las concentraciones obtenidas de cada una de las experiencias.

En las cartas Pareto, la longitud de las barras es proporcional al valor absoluto del efecto estimado, lo que indica la importancia de cada variable. Se determina que una variable es estadísticamente significativa cuando el valor de $t_{experimental}$ es mayor que el valor de $t_{crítico}$, al nivel de confianza del 95%.

Tabla 11: Resultados obtenidos de concentración de alquilfenoles en alga.

Experiencia	4-tOP (mg/kg)	4-OP (mg/kg)	4-n-NP (mg/kg)	NP (mg/kg)
1	-	-	3.62	1.77
2	-	-	36.14	12.91
3	-	-	0.20	-
4	1.77	-	114.07	62.09
5	-	-	4.38	2.04
6	1.44	-	34.93	12.48
7	-	-	0.93	0.47
8	-	-	1.79	0.67
9	-	-	1.69	0.67
10	-	-	20.24	9.83
11	-	-	0.21	-
12	-	-	0.21	-

Los resultado que no superan el LOQ se representan con -

En los resultados se aprecia que el valor de la concentración obtenida para el t-OP y OP no sobrepasa el límite de cuantificación del método. Por ello nos centraremos en la mezcla

de isómeros de nonilfenol NP, y la del nonilfenol lineal 4-n-NP para la evaluación de las variables implicadas en la extracción.

Los bajos valores de concentración obtenidos para el BPA, sugieren que este compuesto no puede atravesar la membrana de polipropileno durante la extracción MASE, lo que hace que el método no pueda ser utilizado para su determinación.

Al analizar los resultados de los nonilfenoles con el software Statgraphics Plus 4.0 se obtuvo la carta Pareto de primer orden mostrada en las Figuras 11 y 12:

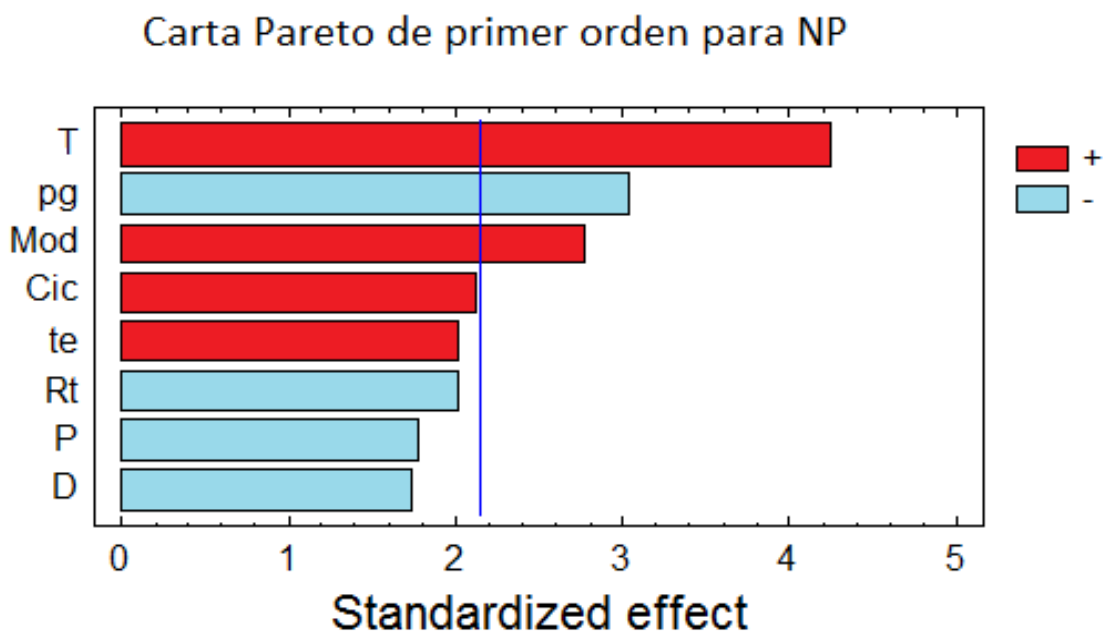


Figura 11: Carta Pareto de la mezcla de isómeros de nonilfenol

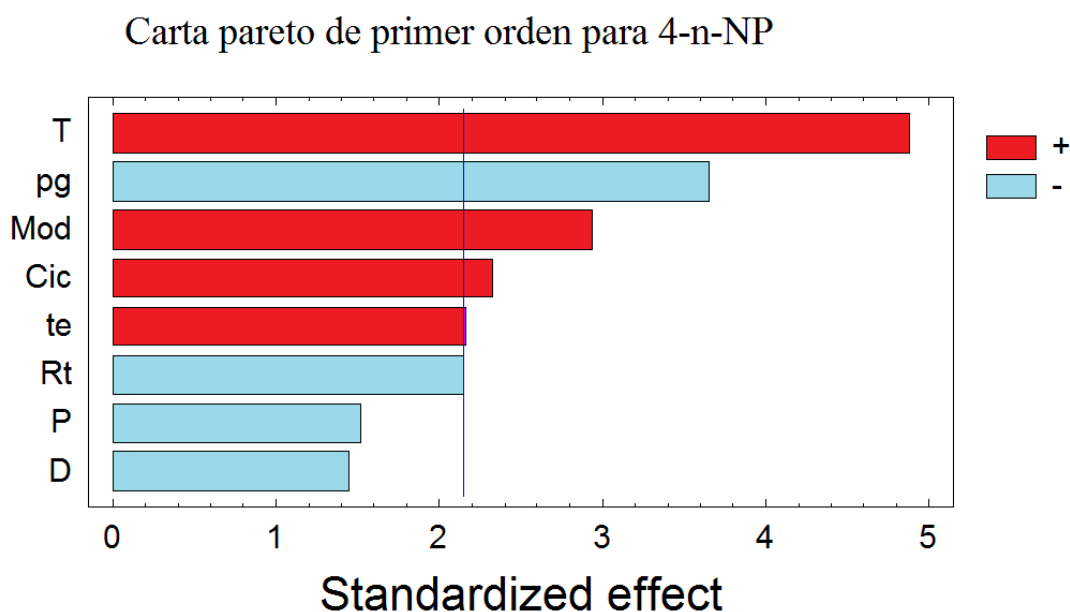


Figura 12: Carta Pareto de 4-n-nonilfenol

Como puede verse las variables estadísticamente significativas son la temperatura de extracción (T), el tiempo de purga (pg) y la concentración de modificador (Mod) para el NP y temperatura de extracción (T), tiempo de purga (G) la concentración de modificador (C), número de ciclos (Cic), tiempo de extracción (te) y ratio muestra dispersante (Rt) para el 4-n-NP. La temperatura de extracción, la concentración de modificador, el número de ciclos y el tiempo de extracción favorecen la extracción, por el contrario el aumento del tiempo de purga y el ratio muestra-dispersante tienen un efecto negativo sobre la extracción del NP. Estas variables se deben optimizar mediante un diseño composicional pero no se recoge en este trabajo.

La variación de la variable no significativa no provoca cambios relevantes en el sistema, por lo que se fija el valor más apropiado teniendo en cuenta el signo su efecto. Según este criterio, el valor fijado sería 1500 psi.

6 CONCLUSIÓN

Conclusión

El método de PHWE cumple con los principios de la química verde, solo se utilizan 5 mL de disolvente orgánico en todas las etapas implicadas en la extracción.

Los resultados obtenidos no fueron concluyentes para el 4-tert-octilfenol y 4-octilfenol debido a su bajo nivel de concentración en las muestras. Sin embargo, para el NP, el diseño de experiencias Plackett-Burman determina que las variables estadísticamente significativas son la temperatura, el tiempo de purga y la cantidad de modificador y para el 4-n-NP la temperatura, el tiempo de purga, la concentración de modificador, el número de ciclos, el tiempo de extracción y el ratio muestra dispersante.

Las temperaturas elevadas mejoran la penetración del agua en la matriz y reducen su carácter apolar. La cantidad de metanol añadida al agua mejora la extracción, ya que los analitos son muy solubles en disolventes orgánicos. El tiempo de extracción y en número de ciclos favorecen la extracción permitiendo que el analito tenga más tiempo para disolverse en el agua. El tiempo de purga afecta de forma negativa a la extracción, posiblemente provocando la volatilización de los analitos, al igual que el ratio muestra-dispersante, que provoca la adsorción de los analitos y dificulta que se arrastren hacia el vial de colección

El método no es válido para la determinación de bisfenol A en ninguna matriz, ya que no puede atravesar la membrana de polipropileno. Sin embargo esta afirmación requiere futuros estudios.

Conclusión

O método de PHWE cumple cos principios da química verde, solo utilízanse 5 mL de disolvente orgánico por extracción.

Os resultados obtidos non son concluintes para o 4-tert-octilfenol e 4-octilfenol, debido ó baixo nivel de concentración nas mostras. Sin embargo, para o NP, o deseño de experiencias Plackett-Burman determina cas variables estadísticamente significativas son a temperatura, o tempo de purga e a cantidade de modificador e para o 4-n-NP a temperatura o tempo de purga, a cantidade de modificador, o número de ciclos, o tempo de extracción e o ratio mostra-dispersante

As temperaturas elevadas melloran a penetración do auga na matriz e reducen o seu carácter apolar. A cantidade de metanol engadida ó auga mellora a extracción, xa que os analitos son moi solubles en disolventes orgánicos. O tempo de extracción e o número de ciclos favorecen a extracción permitindo que o analito teña mais tempo de disolverse na auga. O tempo de purga afecta de forma negativa á extracción, posiblemente provocando a volatilización dos analitos. O ratio mostra-dispersante provoca a adsorción dos analitos e dificulta que se arrastren cara o vial de colección.

O método non é válido pra determinación de bisfenol A en ningunha matriz, xa que non pode atravesala membrana de polipropileno. Sen embargo esta afirmación require futuros estudos

Conclusion

PHWE method complies with the principles of green chemistry, using just 5 mL of organic solvent per extraction.

The results are not concluding for 4-tert-octylphenol and 4-octylphenol, due to the low level of concentration. However, for NP Plackett-Burman experimental designs determined statistically significant variables are the temperature, purge time and amount of modifier and for the 4-n-NP, temperature, purge time modifier concentration, number of cycles, extraction time and sample-dispersant ratio.

Elevated temperatures improves the penetration of water into the matrix and reduce its non-polar character. The amount of methanol added to water improves the extraction, because the analytes are very soluble in organic solvents. Extraction time and cycles improves the extraction allowing the analytes to have more time to get dissolved by the water. The purge time adversely affects the extraction, possibly causing the volatilization of analytes, as well as sample-dispersant ratio, as it difficult the pass of the analytes to the collection vial.

The method is not valid for the determination of bisphenol A in any matrix, as it cannot cross the membrane of polypropylene. However, this requires further study.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Ahel, M., Giger, W., & Schaffner, C. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research*, 28(5), 1143-1152.
- Connell, D. W., Lam, P., Richardson, B., & Wu, R. (2009). *Introduction to ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Corti, A., Frassinetti, S., Vallini, G., D'Antone, S., Fichi, C., & Solaro, R. (1995). Biodegradation of nonionic surfactants. I. Biotransformation of 4-(1-nonyl) phenol by a *Candida maltosa* isolate. *Environmental Pollution*, 90(1), 83-87.
- Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Anderson, D. G., Baetcke, K. P., ... & Patel, Y. M. (1998). Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives*, 106(Suppl 1), 11.
- Groshart, C. P., Okkerman, P. C., Wassenberg, W. B. A., & Pijnenburg, A. M. C. M. (2001). Chemical study on alkylphenols. Rijkswaterstaat, RIKZ.
- Kronholm, J. (2002). Utilization of pressurized hot water and supercritical water in the treatment of polluted water and soil. University of Helsinki.
- Lu, F. R., Ling, B. Q., Sun, Z. Y., Liu, Z., You, Y. Y., & Xia, Y. R. (1990). Treatment of wastewater containing bisphenol A. *Water treatment*, 5(1), 105-124.
- Moreda-Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D., & Bermejo-Barrera, P. (2006). Pressurized liquid extraction as a novel sample pre-treatment for trace element leaching from biological material. *Analytica chimica acta*, 572(2), 172-179.
- Moreda-Pineiro, J., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Moreda-Pineiro, A., & Bermejo-Barrera, P. (2007). Development of a new sample pre-treatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of metals in edible seaweed. *Analytica chimica acta*, 598(1), 95-102.
- Moreda-Pineiro, J., Alonso-Rodríguez, E., Moreda-Pineiro, A., Moscoso-Perez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2012). Use of pressurized hot water extraction and high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma–mass spectrometry for water soluble halides speciation in atmospheric particulate matter. *Talanta*, 101, 283-291.
- Moscoso-Pérez, C., Moreda-Piñeiro, J., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., & Prada-Rodríguez, D. (2008). Pressurized liquid extraction followed by high performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry for arsenic and selenium speciation in atmospheric particulate matter. *Journal of Chromatography A*, 1215(1), 15-20.

- Noelia Salgueiro, *Determinacion de alquilfenoles y bisfenol A en agua de mar mediante cromatografia de liquidos de alta resolución acoplada a espectrometria de masas (HPLC-MS/MS)*, 2011
- Prieto, A., Telleria, O., Etxebarria, N., Fernández, L. A., Usobiaga, A., & Zuloaga, O. (2008). Simultaneous preconcentration of a wide variety of organic pollutants in water samples: Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 1214(1), 1-10.
- Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Rodil, R., Schellin, M., & Popp, P. (2007). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, 1163(1), 288-297.
- Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R., & Brody, J. G. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental science & technology*, 37(20), 4543-4553.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2013). Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1281, 46-53.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2012). Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs. *Journal of Chromatography A*, 1270, 80-87.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2013). Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1281, 46-53.
- Staples, C. A., Dome, P. B., Klecka, G. M., Oblock, S. T., & Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36(10), 2149-2173.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., & Ong, E. S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) Action Plan* [RIN 2070-ZA09]. 2010
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., & Parker, M. G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135(1), 175-182.

www.boe.es

www.caslab.com

www.chromatographyonline.com/recent-advances-pressurized-fluid-extraction
www.gerstel.es/es/MPS-MASE-es.htm

www.portomuinos.com