



Universitat de Girona

**DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES DE
DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN
AIGÜES I SÒLS. CARACTERITZACIÓ DELS
PROCESSOS D'ADSORCIÓ EN DIFERENTS TIPUS
DE SÒLS.**

Gemma SIRVENT MASIAS

ISBN: 84-689-3085-7

Dipòsit legal: GI-765-2005



UdG

Universitat de Girona
Departament de Química
Àrea de Química Analítica

**DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES DE DETERMINACIÓ
DE COMPOSTOS FENÒLICS EN AIGÜES I SÒLS.
CARACTERITZACIÓ DELS PROCESSOS D'ADSORCIÓ EN
DIFERENTS TIPUS DE SÒLS.**

Memòria presentada per
Gemma Sirvent Masias per
optar al grau de Doctor per
la Universitat de Girona.

Girona, 2005

Els estudis que es recullen en aquesta memòria s'han desenvolupat en el marc dels projectes d'investigació:

- “Sistema integrado de técnicas de separación avanzadas. Purificación de productos químicos y valorización de residuos en aguas y suelos contaminados” (referència: QUI1999-0749-C03-03). Programa de la Comisión de Investigación Científica y Técnica (CICYT).
- “Técnicas de separación avanzadas. Procesos integrados de purificación de productos químicos y tratamiento de aguas y suelos contaminados” (referència: PPQ2002-04267-C03-02). Programa de la Comisión de Investigación Científica y Técnica (CICYT).

La realització d'aquest treball ha estat possible per la concessió d'una beca predoctoral per a la formació de personal investigador (FI/FIAP) de la Generalitat de Catalunya (referència: 2001FI 00697). Els estudis recollits al capítol 3 han estat realitzats al *Instituto de Investigación e Análises Alimentarias* de la Universitat de Santiago de Compostela gràcies a un ajut de borsa de viatge concedit per l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya.

Els estudis exposats en aquest treball han donat lloc a les següents publicacions (vegeu annex):

- G. Sirvent, M. Hidalgo, V. Salvadó, "Evaluation of a new solid-phase cartridge for the preconcentration of phenolic compounds in waters", *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 613.
- G. Sirvent, J.M. Sánchez, V. Salvadó, "Preconcentration and determination of priority pollutant phenols in waters at trace levels using a polymeric solid-phase extraction cartridge", *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1524.
- G. Sirvent, J.M. Sánchez, V. Salvadó, "Determination of priority pollutant phenols at low trace levels in soils", *J. Chromatogr. A*, en revisió.
- G. Sirvent, J.M. Sánchez, V. Salvadó, "Characterisation of the adsorption processes of phenolic compounds by soils: influence of the soil components", en preparació.

Ja fa temps que desitjava que arribés el moment d'escriure aquestes paraules. Representen el final d'una etapa, una etapa plena de bones i males estones però que, per sobre de tot, m'ha permès viure de prop el món de la recerca. I quan per fi ha arribat el dia, aquestes paraules es resisteixen a sortir i se'm fa difícil expressar els sentiments i les emocions acumulats sobre un full de paper. Han estat quatre anys intensos de dedicació a la química, però no tot ha estat química durant aquest temps. He tingut la sort de conèixer moltes persones que m'han ajudat a fer que l'experiència del doctorat hagi estat molt positiva, a les quals haig d'agrair moltes coses tant en el terreny professional com en el personal.

Primer de tot voldria donar les gràcies als meus directors de tesi. Victòria, et vull agrair l'haver confiat en mi i haver-me donat la oportunitat d'entrar a formar part del grup de Química Analítica i Ambiental i emprendre aquesta "aventura". Juanma, sé que aquesta és la primera tesi que dirigeixes i que per això et deu fer especial il·lusió el fet de veure-la acabada. Jo estic molt orgullosa de que, finalment, el teu nom figuri en aquest treball i et vull donar les gràcies per involucrar-t'hi quan més necessitava un cop de mà i per les teves orientacions i la teva ajuda constant tot i trobar-te a tants quilòmetres de distància.

A tots vosaltres, companys i companyes de química analítica, moltes gràcies per la vostra amistat i ajuda i per ser la meva segona família durant tot aquest temps. Gràcies Clàudia, Mònica, Enriqueta, Nela, Tolo, Sílvia, Mercè, Marta, Mireia, Eduard, i espero que ningú s'enfadi si destaco a les meves "nenes": Eva, Sònia, Marta i Sara. Gràcies per les bones estones que hem compartit darrera les parets del despatx 232 i molta sort en les vostres tesis, especialment a vosaltres, Marta i Sònia, que ja us trobeu gairebé a la recta final. MOLTS ÀNIMS ! Tampoc em vull oblidar d'aquells que en algun moment han format part del grup: Carolina, Roser, Maribel, Mercè i Àngel.

Als companys orgànics i inorgànics us vull agrair l'haver-me "adoptat" com a una més. Gràcies Cristina, Raül, Isabel, Montse, David, Ester, Annes, Judit, Rafel, Roger, Ivan, Xavi ..., espero no deixar-me a ningú! Gràcies pels sopars de "matxaques" massius i els dinars i cafès plegats que aconseguien que m'aixequés cada dia amb moltes ganes d'anar a treballar.

A los doctores Rafael Cela e Isaac Rodríguez quiero agradecerles el brindarme la oportunidad de trabajar en uno de los grupos de investigación más prestigiosos en el campo de la química analítica. Y a todos los compañeros del IIAA, gracias por recibirme con los brazos abiertos y hacer que pasase en Galicia los dos meses más intensos e inolvidables de mi vida. Besiños a mis niños (David, Lucía y Raquel), a Charo, Lupe, Marías, Eva, Jos, Jose, Jacobo, Carmen, Ruth, Tito, Luis, Óscar... y a todos.

Us vull donar les gràcies especialment a vosaltres, Lídia, Cristines, Anna, Mireia i Nuri, per ser les millors amigues que he tingut mai i desitjo de tot cor que estigueu sempre al meu costat. Heu aconseguit no fer-me pensar constantment en la tesi i juntes hem passat estones inoblidables. I tampoc m'oblido de vosaltres, Josep, Jordi i David.

Finalment vull dedicar aquesta tesi a les dues persones més importants de la meva vida. Elles són les que han patit més de prop el meu caràcter agre en els moments més difícils i les que sempre m'han donat la mà i han estat al meu costat, a les bones i a les dolentes. Va per vosaltres, pares!

“Així com hi ha moments en que la vida canvia en un instant, mai oblidis que l'impossible pot esdevenir un somni fet realitat”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDIX GENERAL

| | |
|---|-----------|
| Resum | 1 |
| Abreviatures | 19 |
| | |
| <u>Capítol 1: Introducció General</u>..... | 23 |
| | |
| Antecedents i problemàtica de la contaminació ambiental..... | 25 |
| Els compostos fenòlics..... | 28 |
| Compostos fenòlics d'origen natural..... | 28 |
| Compostos fenòlics d'origen antropogènic | 30 |
| Orígens i usos..... | 30 |
| Presència dels compostos fenòlics en el medi ambient..... | 33 |
| Toxicitat | 35 |
| Regulacions | 37 |
| Anàlisi de compostos fenòlics | 39 |
| Sistemes de separació i detecció..... | 41 |
| Mètodes cromatogràfics | 41 |
| Mètodes no cromatogràfics | 45 |
| Mètodes de preconcentració | 47 |
| Referències | 51 |
| Objectius | 57 |
| | |
| <u>Capítol 2: Desenvolupament d'un mètode per a la determinació d'onze compostos fenòlics considerats contaminants prioritari per la EPA en aigües naturals</u>..... | 59 |
| | |
| Introducció..... | 61 |
| L'extracció en fase sòlida (SPE)..... | 62 |
| Extracció en fase sòlida de fase reversa | 63 |
| Anàlisi de fenols per SPE de fase reversa | 64 |

| | |
|---|-----------|
| Primers sorbents..... | 64 |
| Noves fases sòlides | 67 |
| Altres mecanismes per a la SPE de fenols | 69 |
| Formats per a SPE..... | 70 |
| Avantatges de la SPE | 71 |
| Compostos fenòlics estudiats | 71 |
| Experimental..... | 73 |
| Reactius | 73 |
| Aparells i material | 74 |
| Procediment experimental..... | 75 |
| Anàlisi de compostos fenòlics | 75 |
| Preconcentració per extracció en fase sòlida | 75 |
| Resultats i discussió | 77 |
| Caracterització del mètode cromatogràfic | 77 |
| Estudis de preconcentració de fenols amb el cartutx Spe-ed Advanta [®] | 81 |
| Caracterització de la matriu sòlida | 81 |
| Avaluació de les condicions d'extracció | 82 |
| Aplicació del mètode a aigües naturals | 87 |
| Avaluació d'altres sorbents per a la preconcentració de fenols | 88 |
| Referències | 91 |

Capítol 3: Desenvolupament d'un mètode per a la determinació de fenols bromosubstituïts i compostos bisfenòlics en aigües..... 95

| | |
|---|------------|
| Introducció | 97 |
| Acoblament GC-MS..... | 98 |
| Tipus d'analitzadors en GC-MS | 100 |
| GC-MS en mode tàndem (GC-MS/MS)..... | 104 |
| Derivatització en cromatografia de gasos | 107 |
| Mètodes de derivatització de compostos fenòlics | 109 |
| Compostos fenòlics estudiats | 115 |
| Experimental..... | 116 |

| | |
|---|------------|
| Reactius..... | 116 |
| Aparells i materials | 117 |
| Procediment experimental | 118 |
| Anàlisi de compostos fenòlics..... | 118 |
| Preconcentració per extracció en fase sòlida | 118 |
| Derivatització de compostos fenòlics..... | 119 |
| Resultats i discussió..... | 120 |
| Caracterització del mètode cromatogràfic | 120 |
| Condicions de treball en MS/MS | 123 |
| Optimització del mètode de derivatització | 126 |
| Preconcentració de compostos fenòlics per SPE | 138 |
| Referències | 142 |

Capítol 4: Desenvolupament d'un mètode per a la determinació d'onze compostos fenòlics considerats contaminants prioritari per la EPA en sòls

| | |
|--|------------|
| Introducció..... | 147 |
| Mètodes d'extracció de fenols en sòls | 148 |
| Mètodes tradicionals | 149 |
| Mètodes instrumentals | 150 |
| Interferències associades a l'extracció de sòls..... | 153 |
| Experimental | 157 |
| Reactius..... | 157 |
| Aparells i material..... | 158 |
| Procediment experimental | 159 |
| Anàlisi dels compostos fenòlics | 159 |
| Mostres de sòl | 160 |
| Extracció del sòl..... | 160 |
| Preconcentració dels extractes per SPE | 161 |
| Resultats i discussió..... | 162 |
| Caracterització del sòl..... | 162 |

| | |
|---|------------|
| Caracterització del mètode | 163 |
| Avaluació de l'etapa d'extracció | 163 |
| Avaluació de l'etapa de <i>clean-up</i> | 163 |
| Efecte de la concentració i la massa de sòl | 167 |
| Validació del mètode | 169 |
| Estudis de degradació de compostos fenòlics | 171 |
| Referències | 177 |

Capítol 5: Estudi de l'adsorció de compostos fenòlics en sòls de diferents característiques **179**

| | |
|---|------------|
| Introducció | 181 |
| L'adsorció com a mètode de descontaminació | 182 |
| El paper de l'adsorció en la mobilitat dels contaminants en el medi | 184 |
| Mecanismes d'adsorció | 186 |
| Caracterització de l'adsorció | 188 |
| Isotermes d'adsorció | 188 |
| Experimental | 194 |
| Reactius | 194 |
| Aparells i material | 194 |
| Procediment experimental | 195 |
| Anàlisi de compostos fenòlics | 195 |
| Estudis d'adsorció | 195 |
| Resultats i discussió | 197 |
| Caracterització del mètode cromatogràfic | 197 |
| Estudis d'adsorció | 199 |
| Estudis preliminars | 201 |
| Isotermes d'adsorció | 205 |
| Referències | 216 |

Conclusions **219**

Annex **225**

RESUM

RESUM

El desenvolupament de mètodes d'anàlisi de compostos fenòlics és una pràctica habitual en molts laboratoris des de l'establiment de mesures legislatives de control de les concentracions d'aquestes substàncies en el medi ambient. Les tècniques cromatogràfiques representen la primera opció per a la determinació de la major part de compostos orgànics, en els que s'inclouen els fenols. Aquests, per les seves propietats de volatilitat i polaritat, poden analitzar-se emprant tant la cromatografia líquida com la cromatografia de gasos i aquesta dualitat s'ha aplicat en aquest treball.

La cromatografia líquida és la tècnica més utilitzada en la determinació de compostos fenòlics ja que no requereix d'una derivatització prèvia dels anàlits per millorar el comportament cromatogràfic dels pics obtinguts. La presència d'anells aromàtics a la seva estructura fa que aquests compostos puguin ser analitzats fàcilment mitjançant HPLC-UV. En el **capítol 2** es desenvolupa un mètode de cromatografia líquida per a la determinació, en aigües, dels onze fenols presents en el mètode 604 de la EPA. La separació dels anàlits s'aconsegueix en un temps inferior a 30 minuts i els resultats obtinguts mostren que el mètode presenta una elevada linealitat (fins a 50 mg·L⁻¹), bones repetibilitats (%RSD < 5 %) i reproductibilitats. Pel que fa als límits de detecció i quantificació del mètode, aquests es troben en el rang de les ppb per a tots els compostos excepte per a pentaclorofenol que es troba en el rang de les ppm.

En la majoria de mètodes de determinació de contaminants orgànics és necessària la introducció d'etapes de preconcentració dels anàlits prèvia a la seva detecció ja que aquests es troben a nivells de traça i les tècniques cromatogràfiques moltes vegades no són prou sensibles per detectar aquests nivells. L'extracció en fase sòlida és, des de fa uns anys, la tècnica de preconcentració més aplicada, per la seva simplicitat i senzillesa i pel gran nombre de fases sòlides disponibles. L'estructura aromàtica dels compostos fenòlics fa que els sorbents que proporcionen millors resultats en l'extracció en fase sòlida d'aquestes substàncies siguin els que presenten una estructura polimèrica contenint parts aromàtiques ja que permeten l'establiment d'interaccions de tipus π - π entre els fenols i la fase sòlida. La introducció de grups hidrofílics dins els polímers i l'ús de sorbents d'elevada àrea superficial milloren el rendiment de la retenció de compostos polars com els fenols. A la present memòria s'ha avaluat l'eficàcia de fases sòlides de diferents característiques, una matriu

polimèrica que conté funcionalitzacions de tipus carbonílic (Spe-ed Advanta[®]), un polímer de divinilbenzè i N-vinilpirrolidona (Oasis HLB), una fase de poliestirè i divinilbenzè (Bakerbond SDB-1) i una matriu de sílice amb cadenes C₁₈. De totes elles, les que ens han proporcionat millors resultats en l'extracció i preconcentració de compostos fenòlics són els sorbents de matriu polimèrica, i més especialment aquells en els que l'estructura conté parts polars. Els percentatges d'extracció obtinguts en general amb les fases polimèriques són molt superiors a les aconseguides amb la matriu C₁₈ per als fenols més polars (fenol, 4-nitrofenol i 2-clorofenol).

Per al cas del sorbent Spe-ed Advanta[®], s'han determinat les condicions òptimes de flux, pH i elució per tal d'utilitzar-lo en l'extracció i preconcentració dels onze compostos fenòlics presents en el mètode 604 de la EPA (capítol 2). Fluxos de mostra superiors a 5 mL·min⁻¹, valors de pH iguals o inferiors a 2 unitats i elucions realitzades amb 2 mL d'acetonitril han permès obtenir recuperacions dels anàlits superiors al 70 % en treballar amb volums de 100 mL a 1 L de mostra i a nivells de concentració de 0.5 a 10 µg·L⁻¹. Igualment s'ha utilitzat el sorbent Spe-ed Advanta[®] en el monitoratge de diferents volums d'aigua natural forticats amb els anàlits anteriors i s'han aconseguit recuperacions quantitatives excepte en treballar amb volums d'un litre de mostra. En aquest cas s'observa que l'elevat percentatge d'àcids húmics i fúlvics presents a la mostra (valor d'oxidabilitat de 58.1 mg·L⁻¹) provoca la saturació parcial del cartutx i, en conseqüència, una disminució de fins el 50 % en les recuperacions de compostos fenòlics.

En el cas de la cromatografia de gasos aplicada a l'anàlisi de fenols es requereix d'una etapa de derivatització prèvia a la detecció per millorar el comportament cromatogràfic i la resolució en la separació. El grup hidroxil fenòlic pot adsorbir-se sobre les superfícies actives de la columna cromatogràfica donant lloc a pics asimètrics i amb molta cua. Igualment és capaç de formar enllaços per pont d'hidrogen intermoleculars i donar lloc a agregats de molècules que difícilment es poden volatilitzar. L'acetilació i la sililació s'han assajat com a mètodes de derivatització de fenols prèviament a la seva anàlisi per GC-MS (**capítol 3**). L'acetilació amb anhídrid acètic i en medi bàsic és un procés relativament llarg ja que requereix el pas dels derivats, un cop formats, a un medi orgànic, a través d'una extracció líquid-líquid. Per aquesta raó i pel fet que els pics dels compostos fenòlics sililats presenten una forma més gausiana, s'ha optat per utilitzar la sililació com a mètode de derivatització dels anàlits. Com a agents sililants s'han avaluat tres reactius comercials que contenen una meitat trifluoroacetamida (MTBSTFA, MSTFA i BSTFA) i s'ha comparat la seva eficàcia en

la derivatització de deu compostos fenòlics pel que fa a la resolució obtinguda per a compostos amb temps de retenció similars, així com en presència d'altres substàncies en el medi de reacció com acetona, metanol o aigua. Els resultats obtinguts mostren que, en general, la presència de traces de metanol i aigua provoca una disminució del rendiment de la reacció de sililació de compostos fenòlics per a tots tres reactius, degut a que aquestes substàncies contenen grups que competeixen amb els fenols pel consum de reactiu derivatitzant i, a banda, són capaces de produir la hidròlisi dels derivats un cop formats. Dels tres reactius, N-metil-N-dimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) ha resultat ésser el més adient per dur a terme la derivatització dels anàlits i les condicions òptimes de derivatització s'han determinat emprant aquest reactiu. A partir d'un disseny experimental de tipus factorial s'ha pogut comprovar que variables com el volum de derivatitzant, la temperatura o el temps de derivatització són paràmetres que no provoquen una variació significativa en el rendiment de la sililació de fenols amb MSTFA, encara que és necessari utilitzar un volum de reactiu en excés perquè els derivats formats siguin estables al llarg del temps. El temps de derivatització tampoc és un paràmetre crític degut a que aquesta té lloc de forma immediata en posar en contacte els anàlits i l'agent derivatitzant a l'interior de l'injector del cromatògraf, amb rendiments similars en treballar amb temperatures d'injecció entre 200 i 300°C.

La cromatografia de gasos aplicada a l'anàlisi de fenols, una vegada derivatitzats, és una tècnica que proporciona resultats molt acurats, especialment quan utilitza l'espectrometria de masses com a sistema de detecció. Emprant l'acoblament GC-MS s'ha desenvolupat un mètode de determinació de bromofenols i compostos bisfenòlics en aigües que presenta un interval de linealitat ample, proporciona límits de quantificació dels anàlits de l'ordre dels pocs $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i permet la identificació dels pics cromatogràfics amb un elevat percentatge de certesa. Addicionalment, l'acoblament de la cromatografia de gasos a l'espectrometria de masses en tàndem permet reduir el soroll de fons provocat per la presència d'interferències en l'anàlisi de mostres complexes com les procedents d'una estació depuradora d'aigües residuals.

L'anàlisi de mostres de sòl requereix una extracció dels anàlits per mitjà de mètodes que, moltes vegades, són dràstics i poc selectius, fet que provoca que es coextreguin un nombre elevat d'interferències juntament amb els compostos d'interès. En el **capítol 4** s'han aprofitat les propietats àcid-base que presenten els compostos fenòlics per desenvolupar un mètode d'extracció dels onze fenols inclosos en el mètode 604 de la EPA per mitjà de solucions alcalines, les quals permeten extreure fàcilment els fenols en la seva forma fenolat. L'inconvenient d'aquesta extracció és que també arrossega les substàncies húmiques i

fúlviques presents al sòl, les quals fan difícil la detecció dels anàlits per cromatografia líquida sense una etapa prèvia de *clean-up* dels extractes. El sorbent polimèric Bakerbond SDB-1, amb matriu de poliestirè-divinilbenzè, s'ha mostrat eficaç en la purificació i concentració de fenols d'extractes de sòls, doncs és capaç de reduir en gran part la banda inicial dels cromatogrames provocada per la presència de substàncies húmiques i fúlviques que dificulta la quantificació dels anàlits amb temps de retenció menors. A diferència de la fase sòlida avaluada en el capítol 2 (Spe-ed Advanta[®]), el cartutx Bakerbond SDB-1 no precisa d'una acidificació dels extractes prèvia al procés SPE per tal d'obtenir recuperacions quantitatives dels anàlits. El mètode global (extracció alcalina del sòl i *clean-up* i preconcentració per SPE amb el cartutx Bakerbond SDB-1) s'ha aplicat a l'anàlisi de diferents porcions d'1-10 grams de sòl fortificades a nivells d'1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ amb els fenols. En tots els casos s'han obtingut valors de recuperació superiors al 80 %, tot i que s'observa que aquests disminueixen a l'augmentar la quantitat de mostra monitoritzada. Un augment en la quantitat de sòl a tractar comporta un augment de les quantitats d'àcids húmics i fúlvics coextretes, les quals poden saturar parcialment la fase sòlida i provocar una disminució en la retenció dels anàlits. El mètode d'extracció i preconcentració s'ha validat per comparació dels resultats obtinguts amb aquells aconseguits amb el mètode oficial 3540 de la EPA (*extracció Soxhlet*) i analitzant un sòl de referència certificat (CRM112-100) que conté vuit dels onze fenols estudiats a nivells de concentració entre 2 i 6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

L'anàlisi de sòls és complexa degut a que els mètodes d'extracció acostumen a ser poc selectius i arrossegueu interferències de la matriu que dificulten la detecció final dels anàlits. En el cas dels compostos fenòlics, així com altres tipus de substàncies, s'ha de considerar un problema afegit, que és que aquests compostos poden patir fenòmens de degradació o adsorció en el sòl. Aquests processos en el sí del sòl s'han pogut constatar mitjançant l'aplicació de dues metodologies diferents de fortificació, una d'elles en la que l'extracció té lloc immediatament després de la fortificació (*spot spiking*) i una altra en la que, un cop realitzada la fortificació del sòl i abans de dur-ne a terme l'extracció, es deixa un temps perquè els contaminants interaccionin amb la matriu sòlida (*slurry spiking*). Els valors de recuperació que s'han obtingut a partir del segon mètode (*slurry spiking*) han resultat ser de fins un 60 % inferiors als aconseguits mitjançant *spot spiking*, fet que ens demostra que, durant el procés d'evaporació del dissolvent, els fenols pateixen transformacions que fan que no siguin detectats en la seva forma original. Aquestes transformacions inclouen adsorció irreversible sobre alguns components del sòl, principalment la matèria orgànica i l'argila, degradació química per l'acció d'enzims i òxids metàl·lics o degradació biològica per la

presència de microorganismes, però el pes específic de cadascun d'aquests fenòmens depèn, en gran mesura, de cada sòl concret. S'ha observat que la degradació de fenols té lloc durant un període de temps llarg, donat que al realitzar extraccions de la mateixa mostra en un interval de temps d'un mes s'ha observat que els valors obtinguts al llarg del temps van disminuint. Aquestes diferències són més acusades quan es conserven les mostres a 4°C respecte a -21°C. D'aquest fet podem extreure que, a l'hora d'analitzar mostres de sòl contaminat amb compostos fenòlics, és necessari conservar-les congelades si es volen mantenir uns nivells de contaminació similars als existents en el moment de la presa de mostra.

Finalment s'han estudiat les propietats pel que fa a l'adsorció de quatre compostos fenòlics (fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol i 2,4-diclorofenol) en sis sòls de diferents característiques (**capítol 5**). Determinar les propietats del sòl i dels compostos fenòlics que més influeixen en les capacitats d'adsorció d'aquestes substàncies en els sòls és útil a l'hora de predir el seu destí un cop abocats al medi natural: si romandran adsorbits al sòl o si, per contra, tindran més tendència a anar a parar als corrents aquosos. S'han determinat les isoterms d'adsorció individuals dels quatre fenols en els sis sòls avaluats, les quals s'han ajustat als models de Freundlich, Langmuir i la Llei de Henry. El fenol mostra, en general, un comportament diferent a la resta de compostos i s'han obtingut per a aquest compost isoterms de tipus H en la majoria de sòls, mentre que 2CP, 2NP i 24dCP presenten isoterms de tipus L. Pel que fa a les característiques dels anàlits, l'augment en les capacitats d'adsorció de fenols és directament proporcional a un increment en la hidrofobicitat d'aquests compostos o a un augment en el nombre de clors a les molècules clorades. Una anàlisi de components principals ens ha permès determinar quines són les característiques del sòl que tenen més influència en els processos d'adsorció de compostos fenòlics. El percentatge de matèria orgànica dels sòls és un dels paràmetres que més influeix en l'adsorció de fenols donat que un augment en la fracció orgànica accessible provoca més possibilitats de formar enllaços de tipus π - π entre l'anell aromàtic fenòlic i parts específiques de les substàncies húmiques. Altres paràmetres que condicionen el grau d'adsorció de fenols en els sòls són el pH d'aquest últim i el seu contingut i tipus de fracció argilosa.

RESUMEN

El desarrollo de métodos de análisis de compuestos fenólicos es una práctica habitual en muchos laboratorios desde el establecimiento de medidas legislativas para el control de los niveles de estas sustancias en el medio ambiente. Las técnicas cromatográficas representan la primera opción para la determinación de la mayor parte de compuestos orgánicos, incluidos los fenoles. Estos, por sus propiedades de volatilidad y polaridad, pueden analizarse utilizando tanto la cromatografía líquida como la cromatografía de gases y esta dualidad se ha aplicado en este trabajo.

La cromatografía líquida es la técnica más utilizada en la determinación de compuestos fenólicos ya que no requiere de una derivatización previa de los analitos para mejorar el comportamiento cromatográfico de los picos obtenidos. La presencia de anillos aromáticos en su estructura hace que estos compuestos puedan ser analizados fácilmente mediante HPLC-UV. En el **capítulo 2** se describe el desarrollo de un método de cromatografía líquida para la determinación en aguas de los once fenoles presentes en el método 604 de la EPA. La separación de los analitos se consigue en un tiempo inferior a 30 minutos y los resultados obtenidos muestran que el método presenta una elevada linealidad (hasta $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), buenas repetibilidades ($\% \text{RSD} < 5 \%$) y reproducibilidades. Por lo que respecta a los límites de detección y cuantificación del método, estos se encuentran en el rango de las ppb para todos los compuestos excepto para pentaclorofenol que se encuentra en el rango de las ppm.

En la mayoría de métodos de determinación de contaminantes orgánicos es necesaria la introducción de etapas de preconcentración de los analitos previa a su detección ya que estos se encuentran a niveles de traza y las técnicas cromatográficas muchas veces no son lo suficientemente sensibles para detectar estos niveles. La extracción en fase sólida es, desde hace unos años, la técnica de preconcentración más aplicada por su simplicidad y sencillez y por el gran número de fases sólidas disponibles. La estructura aromática de los compuestos fenólicos hace que los sorbentes que proporcionan mejores resultados en la extracción en fase sólida de estas sustancias sean los que presentan una estructura polimérica que contenga partes aromáticas, ya que permiten el establecimiento de interacciones de tipo π - π entre los fenoles y la fase sólida. La introducción de grupos hidrofílicos en los polímeros y el uso de sorbentes con área superficial elevada mejoran el rendimiento de la extracción de compuestos polares como los fenoles. En la presente memoria se ha evaluado la eficacia de fases sólidas de

diferentes características, una matriz polimérica que contiene funcionalizaciones de tipo carbonílico (Spe-ed Advanta[®]), un polímero de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona (Oasis HLB), una fase de poliestireno y divinilbenceno (Bakerbond SDB-1) y una matriz de sílice con cadenas C₁₈. De todas ellas, las que han proporcionado mejores resultados en la extracción y preconcentración de compuestos fenólicos son los sorbentes de matriz polimérica y más especialmente aquellos en los que la estructura contiene grupos polares. Los porcentajes de extracción obtenidos con las fases poliméricas son, en general, muy superiores a los conseguidos con la matriz C₁₈ para los fenoles más polares (fenol, 4-nitrofenol y 2-clorofenol).

Para el sorbente Spe-ed Advanta[®] se han determinado las condiciones óptimas de flujo, pH y elución para utilizarlo en la extracción y preconcentración de los once compuestos fenólicos presentes en el método 604 de la EPA (capítulo 2). Flujos de muestra superiores a 5 mL·min⁻¹, valores de pH iguales o inferiores a 2 unidades y eluciones realizadas con 2 mL de acetonitrilo han permitido obtener recuperaciones de los analitos superiores al 70 % al trabajar con volúmenes de 100 mL a 1 L de muestra, y a niveles de concentración de 0.5 a 10 µg·L⁻¹. Asimismo se ha utilizado el sorbente Spe-ed Advanta[®] en el monitoraje de diferentes volúmenes de agua natural fortificados con los analitos anteriores y se han conseguido recuperaciones cuantitativas excepto al trabajar con volúmenes de un litro de muestra. En este caso se observa que el elevado porcentaje de ácidos húmicos y fúlvicos presenten en la muestra (valor de oxidabilidad de 58.1 mg·L⁻¹) provoca la saturación parcial del cartucho y, en consecuencia, una disminución de hasta el 50 % en las recuperaciones de compuestos fenólicos.

En el caso de la cromatografía de gases aplicada al análisis de fenoles se requiere de una etapa de derivatización previa a la detección para mejorar el comportamiento cromatográfico y la resolución en la separación. El grupo hidroxilo fenólico sufre adsorción sobre las superficies activas de la columna cromatográfica dando lugar a picos asimétricos y con mucha cola. Igualmente es capaz de formar enlaces por puente de hidrógeno intermoleculares y dar lugar a agregados de moléculas que difícilmente pueden ser volatilizados. La acetilación y la sililación se han ensayado como métodos de derivatización de fenoles previamente a su análisis por GC-MS (**capítulo 3**). La acetilación con anhídrido acético y en medio básico es un proceso relativamente largo ya que requiere el paso de los derivados, una vez formados, a un medio orgánico, a través de una extracción líquido-líquido. Por esta razón y por el hecho que los picos de los compuestos fenólicos sililados presentan una forma más gaussiana, se ha

optado por utilizar la sililación como método de derivatización de los analitos. Como agentes sililantes se han evaluado tres reactivos comerciales que contienen una mitad trifluoroacetamida (MTBSTFA, MSTFA y BSTFA) y se ha comparado su eficacia en la derivatización de diez compuestos fenólicos con respecto a la resolución proporcionada para compuestos con tiempos de retención similares, así como en presencia de otras sustancias en el medio de reacción como acetona, metanol o agua. Los resultados obtenidos muestran que, en general, la presencia de trazas de metanol y agua provoca una disminución del rendimiento de la reacción de sililación de compuestos fenólicos para los tres reactivos, debido a que estas sustancias contienen grupos que compiten con los fenoles por el consumo de derivatizante y, además, son capaces de producir la hidrólisis de los derivados una vez formados. De los tres reactivos, N-metildimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) ha resultado ser el más adecuado para llevar a cabo la derivatización de los analitos y las condiciones óptimas de derivatización se han determinado utilizando este reactivo. A partir de un diseño experimental de tipo factorial se ha podido comprobar que variables como el volumen de reactivo derivatizante, la temperatura o el tiempo de derivatización son parámetros que no provocan una variación significativa del rendimiento de la sililación de fenoles con MSTFA, aunque es necesario utilizar un volumen de reactivo en exceso para garantizar la estabilidad de los derivados formados. El tiempo de derivatización tampoco es un parámetro crítico debido a que esta tiene lugar de forma inmediata en poner en contacto los analitos y el agente derivatizante en el interior del inyector del cromatógrafo, con rendimientos similares al trabajar con temperaturas de inyección entre 200 y 300 °C.

La cromatografía de gases aplicada al análisis de fenoles, una vez derivatizados, es una técnica que proporciona resultados muy sensibles, especialmente cuando utiliza la espectrometría de masas como sistema de detección. Empleando esta técnica se ha desarrollado un método de determinación de bromofenoles y compuestos bisfenólicos en aguas que presenta un amplio intervalo de linealidad, proporciona límites de cuantificación de los analitos del orden de los pocos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y permite la identificación de los picos cromatográficos con un elevado porcentaje de certeza. Adicionalmente, el acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas en tándem permite reducir el ruido de fondo provocado por la presencia de interferencias en el análisis de muestras complejas como las procedentes de una estación depuradora de aguas residuales.

El análisis de muestras de suelo requiere una extracción de los analitos mediante métodos que, muchas veces, son drásticos y poco selectivos, hecho que provoca que se coextraigan un número elevado de interferencias juntamente con los compuestos de interés.

En el **capítulo 4** se han aprovechado las propiedades ácido-base que presentan los compuestos fenólicos para desarrollar un método de extracción de los once fenoles incluidos en el método 604 de la EPA mediante soluciones alcalinas, las cuales permiten extraer fácilmente los fenoles en su forma fenolato. El inconveniente de esta extracción es que también arrastra las sustancias húmicas y fúlvicas presentes en el suelo, las cuales hacen difícil la detección de los analitos por cromatografía líquida sin una etapa previa de *clean-up* de los extractos. El sorbente polimérico Bakerbond SDB-1, con matriz de poliestireno-divinilbenceno, ha demostrado ser eficaz en la purificación y concentración de fenoles de extractos de suelos pues es capaz de reducir en gran parte la banda inicial de los cromatogramas provocada por la presencia de sustancias húmicas y fúlvicas, que dificulta la cuantificación de los analitos con tiempos de retención inferiores. A diferencia de la fase sólida evaluada en el capítulo 2 (Speed Advanta[®]), el cartucho Bakerbond SDB-1 no precisa de una acidificación de los extractos previa al proceso SPE para obtener recuperaciones cuantitativas de los analitos. El método global (extracción alcalina del suelo y *clean-up* y preconcentración por SPE con el cartucho Bakerbond SDB-1) se ha aplicado al análisis de diferentes porciones de 1-10 gramos de suelo fortificadas a niveles de 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ con los fenoles. En todos los casos se han obtenido valores de recuperación superiores al 80 %, aunque se observa que estos disminuyen al aumentar la cantidad de muestra. Un aumento en la cantidad de suelo extraído comporta un aumento de las concentraciones de ácidos húmicos y fúlvicos coextraídos, las cuales pueden saturar parcialmente la fase sólida y provocar una disminución en la retención de los analitos. El método de extracción y preconcentración se ha validado por comparación de los resultados obtenidos con aquellos conseguidos con el método oficial 3540 de la EPA (*extracción Soxhlet*) y analizando un suelo de referencia certificado (CRM112-100) que contiene ocho de los once fenoles estudiados a niveles de concentración entre 2 y 6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

El análisis de suelos es complejo debido a que los métodos de extracción acostumbran a ser poco selectivos y arrastran interferencias de la matriz que dificultan la detección final de los analitos. En el caso de los compuestos fenólicos, así como otros tipos de sustancias, ha de considerarse un problema añadido que es que estos compuestos pueden sufrir fenómenos de degradación o adsorción en el suelo. Estos procesos que ocurren en el seno del suelo se han podido constatar mediante la aplicación de dos metodologías diferentes de fortificación, una de ellas en la que la extracción tiene lugar inmediatamente después de la fortificación (*spot spiking*), y otra en la que, una vez realizada la fortificación del suelo y antes de dar paso a su extracción, se deja transcurrir un tiempo para que los contaminantes interactúen con la matriz sólida (*slurry spiking*). Los valores de recuperación que se han obtenido a partir del

segundo método (*slurry spiking*) han resultado ser hasta el 60 % inferiores a los conseguidos mediante *spot spiking*, hecho que demuestra que, durante el proceso de evaporación del disolvente, los fenoles sufren transformaciones que hacen que no puedan ser detectados en su forma original. Estas transformaciones incluyen adsorción irreversible sobre alguno de los componentes del suelo, principalmente la materia orgánica y la arcilla, degradación química por la acción de enzimas y óxidos metálicos o degradación biológica por la presencia de microorganismos, pero el peso específico de cada uno de estos fenómenos depende, en gran medida, de cada suelo concreto. Se ha constatado que la degradación de fenoles tiene lugar durante un periodo de tiempo largo, dado que al realizar extracciones de la misma muestra en un intervalo de tiempo de un mes se ha observado que los valores obtenidos a lo largo del tiempo van disminuyendo. Estas diferencias son mayores cuando se conservan las muestras a 4°C respecto a -21°C. De este hecho podemos extraer que, al analizar muestras de suelo contaminadas con compuestos fenólicos, es necesario conservarlas congeladas si se quieren mantener unos niveles de contaminación similares a los existentes en el momento de la toma de muestra.

Finalmente se han estudiado las propiedades de adsorción de cuatro compuestos fenólicos (fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol y 2,4-diclorofenol) en seis suelos de diferentes características (**capítulo 5**). Determinar las propiedades del suelo y de los compuestos fenólicos que más influencia tienen en las capacidades de adsorción de estas sustancias en los suelos es útil a la hora de predecir su destino una vez vertidos en el medio natural: si permanecerán adsorbidos en el suelo o si tendrán más tendencia a alcanzar los corrientes acuosos. Se han determinado las isotermas de adsorción individuales de los cuatro fenoles en los seis suelos evaluados, las cuales se han ajustado a los modelos de Freundlich, Langmuir y la Ley de Henry. El fenol muestra, en general, un comportamiento diferente al resto de compuestos, habiéndose obtenido isotermas de tipo H para este compuesto en la mayoría de suelos, mientras que 2CP, 2NP y 24dCP presentan isotermas de tipo L. Por lo que respecta a las características de los analitos, el aumento en las capacidades de adsorción de fenoles es directamente proporcional a un incremento en la hidrofobicidad de estos compuestos o a un aumento en el número de átomos de cloro en las moléculas cloradas. Un análisis de componentes principales ha permitido determinar cuales son las características del suelo que tienen más influencia en los procesos de adsorción de compuestos fenólicos. El porcentaje de materia orgánica de los suelos es uno de los parámetros que más influye en la adsorción de fenoles dado que un aumento en la fracción orgánica accesible provoca más posibilidades de formar enlaces de tipo π - π entre el anillo aromático fenólico y partes específicas de las

sustancias húmicas. Otros parámetros que condicionan el grado de adsorción de fenoles en los suelos son el pH de este último y su contenido y tipo de fracción arcillosa.

ABSTRACT

Phenols form a heterogenic compound family that has been found to have a detrimental effect on human health and to alter the taste and odour of water. Given the production of these contaminating compounds has increased considerably, both the EU and the EPA have established limits for the presence in the environment. The strictness of this legislation has made it necessary to develop more sensitive analytical methods to allow the detection of phenols at trace levels and to monitor their distribution in the different environmental contexts in which they are found.

In this thesis, gas and liquid chromatographic methods are developed for the determination of phenolic compounds in water and soil samples. A liquid chromatographic method is developed for the determination of the eleven phenols included in the EPA priority list of contaminants. As liquid chromatographic methods lack sensitivity a preconcentration step is required. We have employed and evaluated three different polymeric solid phases, Spe-ed Advanta, Bakerbond SDB-1 and Oasis-HLB, and compared them with conventional silica C₁₈ solid phase. The best results are obtained with the polymeric sorbents containing polar groups. In the case of Spe-ed Advanta the optimum conditions are found to be: sample flow rate, 5 mL·min⁻¹ and sample pH ≤ 2. Recoveries of the analytes > 70% are obtained on processing sample volumes between 100 mL and 1 L at spiked concentrations of 0.5 to 10 µg·L⁻¹. The experiment has also been performed using 1 L of spiked river water with it being found that the high humic and fulvic acid content of the samples causes the partial saturation of the cartridge and, as a consequence, a reduction of up to 50% in the recovery of phenolic compounds.

A method for the determination of bromo-phenolic compounds and substituted bisphenolic A compounds by GC-MS is also developed. In order to improve the sensitivity and resolution of the gas chromatographic method, a derivatisation step is introduced. Both acetylation and silylation are tested as derivatisation methods for phenols before GC-MS analysis with silylation being found to give the best results. Three silylating agents, MTBSTFA, MSTFA and BSTFA, are evaluated and compared. The presence of methanol and water in the reaction medium causes the hydrolysis of the derivatives and a decrease in the yield of the reaction. MSTFA gives the best results in terms of efficiency and stability. In order to find the best experimental conditions for the derivatisation step a factorial

experimental design is used. An excessive volume of the reactive is required to increase the stability of the derivatives. The method developed gives a wide interval of linearity, low quantification limits (few $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), and permits the precise identification of the analytes. With GC-MS/MS it is possible to reduce the background noise resulting from the presence of interferences in the case of complex samples such as those from wastewater treatment plants.

The liquid chromatographic method developed for the determination of the eleven phenolic compounds of the EPA's list has been adapted for the determination of the compounds in soils using Bakerbond SDB-1 in the clean-up and concentration steps. The extraction of the analytes from the soil is carried out with alkaline solutions at different pH's. The disadvantage of this method is that humic and fulvic acids are co-extracted with the analytes resulting in interferences appearing in the chromatograms, which make the quantification and identification of more polar phenolic compounds difficult. Bakerbond SDB-1 retains interfering substances with great efficiency and the chromatograms are easier to interpret after their use in the clean-up step. Furthermore, high analyte concentration factors are achieved.

Our method is applied in the analysis of 1-10 gr. portions of spiked soils at 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ concentration levels of phenolic compounds resulting in recoveries $> 80\%$ being obtained. A higher amount of processed soil increases the humic and fulvic acid content and reduces the recovery rates of the analytes. This analytical method is successfully validated in two ways: by comparison with the official method 3540 of the EPA and by the use of a certified reference soil (CRM112-100).

We also study the effect of two soil spiking techniques on the recovery rates of the analytes. In spot spiking, extraction is performed immediately after the fortification process. In slurry spiking, some time is left before extraction is carried out to allow the contaminants to interact with the solid matrices in order for natural conditions to be reproduced. Recovery values with slurry spiking prove to be 60% lower than values obtained for spot spiking. This can be explained by the fact that although the spiked soil is kept at 4 °C, chemical and biological degradation of the phenolic compounds takes place during the period of interaction with the matrix. We conclude from this that for the preservation of the initial conditions the freezing of the samples is required.

The interaction between some phenolic compounds and six soils of varying characteristics is studied due to its relation with the adsorption of the analytes by the soil. We determined the individual adsorption isotherms of the four phenols and six soils studied. These are adjusted to the Freundlich and Langmuir models and to Henry's Law. The shape of the curves was analysed with the Gilles model. Phenol, the most polar of the compounds

studied, shows considerably lower adsorption than the other more hydrophobic compounds and especially those containing chloro groups. Applying principal component analysis (PCA) we find that the organic matter content, the pH of the soil, and clay content are the main parameters affecting the adsorption processes as well as the chemical structure and hydrophobicity of the analytes.

ABREVIATURES

ABREVIATURES

| | |
|------------------|--|
| AED | Detector d'emissió atòmica |
| ASE | Extracció amb solvents accelerada |
| ATP | Trifosfat d'adenosina |
| BSTFA | N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida |
| CE | Electroforesi capil·lar |
| CFC | Compostos clorofluorocarbonats |
| CI | Ionització química |
| ECD | Detector de captura d'electrons |
| ED | Detector electroquímic |
| EI | Ionització per impacte electrònic |
| EPA | Agència de Protecció del Medi Ambient (USA) |
| FD | Detector de fluorescència |
| FID | Detector d'ionització de flama |
| GC | Cromatografia de gasos |
| ICP-AES | Detector d'emissió atòmica amb atomització per plasma |
| i.d. | Diàmetre intern |
| IMAC | Cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat |
| LC o HPLC | Cromatografia líquida d'alta resolució |
| LD ₅₀ | Dosi letal 50% |
| LLE | Extracció líquid-líquid |
| LOD | Límit de detecció |
| LOQ | Límit de quantificació |
| MAE | Extracció assistida per microones |
| MAC | Màxima concentració admissible |
| MIP | Polímer d'impressió molecular |
| MS | Espectrometria de masses |
| MS/MS | Espectrometria de masses en tàndem |
| MSPD | Extracció per dispersió en matriu de fase sòlida |
| MSTFA | N-metil-N-dimetilsililtrifluoroacetamida |
| MTBSTFA | N-metil-N- <i>tert</i> butildimetilsililtrifluoroacetamida |

| | |
|-------------|---|
| m/z..... | Relació massa/càrrega |
| PAHs..... | Hidrocarburs aromàtics policíclics |
| PCDDs..... | Dibenzodioxines policlorades |
| PCDFs..... | Dibenzofurans policlorats |
| PFE..... | Extracció amb fluids pressuritzats (=ASE) |
| ppb..... | Parts per bilió (volum) |
| ppm..... | Parts per milió (volum) |
| PS-DVB..... | Poliestirè-divinilbenzè |
| rpm..... | Revolucions per minut |
| RSD..... | Desviació estàndard relativa |
| SFC..... | Cromatografia amb fluids supercrítics |
| SFE..... | Extracció amb fluids supercrítics |
| SPE..... | Extracció en fase sòlida |
| SPME..... | Microextracció en fase sòlida |
| UV-Vis..... | Detector ultraviolat-visible |

INTRODUCCIÓ GENERAL

| | |
|--|-----------|
| 1.1 ANTECEDENTS I PROBLEMÀTICA DE LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL. .. | 25 |
| 1.2 ELS COMPOSTOS FENÒLICS | 28 |
| 1.2.1 Compostos fenòlics d'origen natural | 28 |
| 1.2.2 Compostos fenòlics d'origen antropogènic | 30 |
| 1.2.2.1 Orígens i usos | 30 |
| 1.2.2.2 Presència dels compostos fenòlics en el medi ambient | 33 |
| 1.2.2.3 Toxicitat | 35 |
| 1.2.2.4 Regulacions | 37 |
| 1.3 ANÀLISI DE COMPOSTOS FENÒLICS..... | 39 |
| 1.3.1 Sistemes de separació i detecció | 41 |
| 1.3.1.1 Mètodes cromatogràfics | 41 |
| 1.3.1.1.1 Cromatografia de Gasos (GC)..... | 41 |
| 1.3.1.1.2 Cromatografia líquida (LC o HPLC) | 43 |
| 1.3.1.2 Mètodes no cromatogràfics | 45 |
| 1.3.1.2.1 Electroforesi capil·lar (CE) | 45 |
| 1.3.1.2.2 Altres mètodes d'anàlisi..... | 46 |
| 1.3.2 Mètodes de preconcentració | 47 |
| 1.4 REFERÈNCIES..... | 51 |
| 1.5 OBJECTIUS | 57 |

1.1 ANTECEDENTS I PROBLEMÀTICA DE LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL.

La preocupació per les problemàtiques que afecten al medi ambient ha pres especial rellevància en els darrers anys quan l'espècie humana ha esdevingut conscient de que la seva actuació provoca, en molts casos, el trencament de l'equilibri ecològic que existeix en el planeta. Aquesta pèrdua de l'equilibri natural és conseqüència directa de l'evolució de l'home a través de la història i del tipus de societat que hem construït, marcada per la necessitat d'un progrés continu. El grau de desenvolupament de la societat actual, les grans concentracions urbanes i industrials derivades del ràpid creixement de la població i la necessitat d'un avenç tecnològic constant han derivat en la introducció de substàncies i/o energia en el medi que poden causar danys sobre la salut humana, perjudicar els sistemes naturals i interferir sobre els usos legítims del medi ambient. Això és el que s'entén per contaminació ambiental [1]. Aquestes substàncies introduïdes en el medi ambient degut a l'activitat antropogènica, que a

partir d'ara anomenarem contaminants, tenen principalment el seu origen en les activitats industrials. Poden exercir efectes negatius directes sobre el medi, com els elements radioactius o substàncies de naturalesa diversa de caràcter tòxic i moltes vegades bioacumulables (plaguicides, hidrocarburs aromàtics policíclics, policlorobifenils, fenols, metalls pesats, etc.), poden provocar efectes ambientals nocius a llarg termini com és el cas dels compostos clorofluorocarbonats (CFCs), responsables en gran mesura del deteriorament de la capa d'ozó o, per contra, poden ser substàncies que, malgrat ser d'origen natural, han augmentat continuadament els seus nivells originant efectes molt negatius, com és el cas del diòxid de carboni atmosfèric i la seva relació amb l'efecte hivernacle.

El plantejament inicial que es va fer amb aquests contaminants, apareguts principalment com a conseqüència de l'avenç científic, tecnològic i industrial de la societat, va ser molt diferent a l'enfocament actual. En un primer moment es va considerar que podrien ser assimilats per la pròpia naturalesa, és a dir, transformats en substàncies innòcues o diluïts de forma suficient, però el seu creixement exponencial i el descobriment de la persistència i bioacumulació d'alguns d'ells va desembocar, durant els anys 60 i 70, a la prohibició de la producció de determinades substàncies o a la limitació del seu ús [2]. De la mateixa manera, va ser necessària la implantació, per part dels governs i organismes competents, de polítiques de control de les substàncies tòxiques fent difusió de les llistes dels contaminants principals i establint els límits màxims permesos d'aquests a les diferents matrius ambientals (aire, aigua i sòl). Als Estats Units, l'organisme que fa aquest control és l'Agència de Protecció del Medi Ambient (*Environmental Protection Agency*, **US-EPA**), la qual classifica les substàncies perilloses en funció del seu poder corrosiu, índex d'ignició, reactivitat i toxicitat. Igualment, la **Comunitat Europea** va crear la *Directiva de Substàncies Perilloses* (76/464/EEC) adoptada al 1976 que inclou dues llistes, la Llista 1 (o Llista negra) i la Llista 2 (o Llista grisa). (**Taula 1.1**)

Llista 1 (129 productes químics especificats)

hidrocarburs clorats

clorofenols

cloroanilines i nitrobenzens

hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs)

productes químics inorgànics (metalls, compostos de Cd, As, Hg)

dissolvents

plaguicides

altres (clorur de benzil, àcid cloroacètic, cloroetanol, dibromometà, diclorobenzidina,

dietilamina, epiclorhidrina, isopropilbenzè, xilens, etc.)

Llista 2

Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Se, As, Sb, Mo, Ti, Sn, Ba, Be, B, U, V, Co, Tl, Te, Ag i els seus compostos
 biocides i derivats no inclosos a la llista 1
 compostos orgànics de Si
 compostos inorgànics de P
 olis minerals i hidrocarburs derivats del petroli
 cianides i fluorides
 NH₃ i NO₃⁻

Taula 1.1 Llista de substàncies perilloses de la Comunitat Europea (EC, 1976, 1981).

Tal com ja s'ha apuntat abans, a més d'establir quines són les substàncies a les que s'associa un major risc de pol·lució, és necessari definir en quins nivells poden repercutir sobre la salut de l'home i quines conseqüències poden derivar-se de la seva exposició. Aquestes substàncies poden entrar al nostre cos per ingestió, per inhalació o per contacte amb la pell. En els casos més extrems, de substàncies altament corrosives, l'exposició pot derivar en danys localitzats a les cèl·lules de la via d'entrada a l'organisme, no obstant això, en la majoria de casos, els efectes tòxics només apareixen després de que el contaminant hagi estat transportat a través del corrent sanguini. En funció de l'efecte que provoquen, els contaminants es poden dividir en [3]:

Tòxics → qualsevol substància que causa un deteriorament biològic. És el grup més extens.

Teratològics → substàncies capaces de produir malformacions en el procés normal de reproducció per augment de la mortalitat o per defectes a la descendència.

Mutagènics → substàncies que condueixen a canvis genètics hereditaris.

Cancerígens → qualsevol substància que provoca alteracions en els factors que regulen el creixement i la replicació de les cèl·lules (aparició de tumors).

Es defineix *dosi resposta* com la concentració de contaminant a la qual apareixen efectes perjudicials de forma significant. Els efectes tòxics aguts es quantifiquen mitjançant la realització d'experiments sobre animals en els quals es determina la dosi que causa la mort del 50 % dels organismes objecte d'estudi (valor de LD₅₀). Considerant aquests resultats es desenvolupen els estàndards de qualitat i de salut dels diferents medis on s'agrupen els nivells màxims permesos de cada tipus de substància en funció dels efectes que provoquen. La **Taula**

1.2 mostra els estàndards de qualitat de l'aigua de consum desenvolupats per la EPA d'alguns compostos.

| | Estàndards de Qualitat | | Estàndards de Salut | | | | Grup de càncer |
|--------------|--|--|---|---|--|--|--------------------|
| | MCLG ⁱ (mg·L ⁻¹) | MCL ⁱⁱ (mg·L ⁻¹) | menys 10 Kg 1 dia ^{vi} (mg·L ⁻¹) | RfD ⁱⁱⁱ (mg·Kg ⁻¹ ·dia ⁻¹) | temps de vida ^{iv} (mg·L ⁻¹) | mg·L ⁻¹ en risc càncer 10 ⁻⁴ ^v | |
| 2-clorofenol | --- | --- | 0.5 | 0.005 | 0.04 | --- | D ^{vii} |
| fenol | --- | --- | 6 | 0.6 | 4 | --- | D |
| bromoform | zero | 0.08 | 5 | 0.02 | --- | 0.4 | B2 ^{viii} |

ⁱ Màxima concentració de contaminant a la qual no es detecten efectes adversos sobre la salut de les persones.

ⁱⁱ Màxima concentració de contaminant admesa en aigua pel consum humà.

ⁱⁱⁱ Dosi de referència. Valor estimat de dosi diària sense efectes adversos sobre la salut per a una exposició de per vida.

^{iv} Concentració de contaminant en aigua de consum humà tolerable diàriament per a un temps d'exposició il·limitat.

^v Concentració de contaminant en aigua de consum humà que provoca càncer en 1 cas de cada 10000.

^{vi} Concentració de contaminant en aigua de consum humà tolerable diàriament per a un temps d'exposició d'un dia.

^{vii} No classificable com a cancerigen en humans.

^{viii} B: pot provocar càncer. B2: indica suficient evidència en animals però no hi ha evidència per als humans.

Taula 1.2 Estàndards de Qualitat de l'aigua per al consum humà d'alguns compostos segons l'Agència de Protecció del Medi Ambient (EPA 822-B-00-001).

1.2 ELS COMPOSTOS FENÒLICS

El nom de *compostos fenòlics* s'empra per designar un extens nombre de compostos, químicament diversos, que tenen en comú la presència d'un anell aromàtic amb un o més grups hidroxil a la seva estructura i que poden presentar, a més, altres tipus de grups funcionals que inclouen els ésters, èters, grups alquil, grups halogenats, grups nitro, etc.

La procedència d'aquest tipus de compostos és diversa. Per una banda els podem trobar de forma natural però també poden tenir un origen antropogènic i trobar-se a la natura com a conseqüència de processos industrials.

1.2.1 Compostos fenòlics d'origen natural

Els compostos fenòlics d'origen natural s'inclouen dins el grup dels anomenats metabòlits secundaris, substàncies químiques que les plantes produeixen per elles mateixes i que, tot i no estar directament lligades al seu creixement, intervenen en els mecanismes d'autodefensa contra les plagues. Són nombrosos els estudis que demostren la importància

dels compostos fenòlics en aquest procés natural. Alguns dels principals compostos fenòlics d'origen natural es recullen a la **Taula 1.3** [4].

| nombre d'àtoms de carboni | esquelet bàsic | classe |
|---------------------------|---|--|
| 6 | C_6 | fenols simples, benzoquinones |
| 7 | $C_6 - C_1$ | àcids fenòlics |
| 8 | $C_6 - C_2$ | acetofenona, àcid fenilacètic |
| 9 | $C_6 - C_3$ | àcid hidroxicinnàmic, coumarin, isocoumarin |
| 10 | $C_6 - C_4$ | naftoquinona |
| 13 | $C_6 - C_1 - C_6$ | xantona |
| 14 | $C_6 - C_2 - C_6$ | antraquinona |
| 15 | $C_6 - C_3 - C_6$ | flavonoids, isoflavonoids |
| 18 | $(C_6 - C_3)_2$ | lignans, neolignans |
| 30 | $(C_6 - C_3 - C_6)_2$ | biflavonoids |
| n | $(C_6 - C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6 - C_3 - C_6)_n$ | lignins catecolmelanina (tannins condensats) |

Taula 1.3 Principals classes de fenols d'origen natural (presentes en plantes).

Molts d'aquests compostos, que es formen a partir de rutes biosintètiques com la ruta de l'àcid xiquímic, tenen una química complicada ja que es troben presents a les plantes en forma conjugada, principalment amb residus de sucres. Una de les raons d'aquest acoblament és que molts d'aquests compostos són tòxics quan es troben en forma lliure mentre que perden parcialment aquesta toxicitat quan estan conjugats amb altres molècules. Així, per exemple, alguns compostos fenòlics de baix pes molecular com el timol s'utilitzen com antisèptics en medicina fent ús de la seva toxicitat. Alguns productes de consum general, com és el cas de certes verdures, el vi negre, el cacau, suc de determinades fruites o el cafè, contenen compostos fenòlics que poden ser beneficiosos per al cos humà perquè es considera que juguen un paper important en la reducció del risc de patir malalties cròniques i degeneratives [5-7]. Un clar exemple és l'oli d'oliva verge, el qual té un contingut en fenòlics naturals quatre vegades superior als olis refinats. Aquests compostos, amb propietats antioxidants, són capaços de reduir l'oxidació del colesterol LDL (o colesterol dolent), procés clau en el desenvolupament de malalties cardíques [8,9].

1.2.2 Compostos fenòlics d'origen antropogènic

1.2.2.1 Orígens i usos

Tal com ja s'ha comentat, no tots els compostos fenòlics es troben de forma natural. Molts derivats tenen un origen antropogènic i s'originen com a residus procedents de processos industrials com la producció de plàstics, tints, alguns fàrmacs, antioxidants, etc., així com derivats del seu ús com a plaguicides, bactericides o conservadors de la fusta.

El **fenol** és el compost més senzill de tota la gamma de compostos fenòlics ja que conserva àtoms d'hidrogen sobre les cinc posicions de l'anell aromàtic susceptibles de ser substituïdes. El fenol es pot trobar, de forma natural, en restes de matèria orgànica en descomposició com vegetals o també en el carbó, d'on es va aïllar per primera vegada al 1834. Aquesta va passar a ser la principal font de fenol fins a la Primera Guerra Mundial quan es va desenvolupar el primer mètode sintètic d'obtenció de fenol basat en la sulfonació del benzè.

El fenol és present en nombrosos processos industrials. El seu ús majoritari és com intermedi sintètic en la producció de resines fenòliques que s'utilitzen en laminats, a la fusta contraxapada, com a adhesius o com a capa de protecció de diverses superfícies. També s'utilitza com a preservador en la manufactura de pells, tèxtils (és important el seu ús en la producció de caprolactam, intermedi sintètic en la producció de niló 6 i altres fibres sintètiques), plàstics, olis lubricants, productes per a l'automoció, pintures o vernissos o en el procés de refinat del petroli, entre altres [10]. El fenol és també un poderós desinfectant i bactericida per la qual cosa no és estrany trobar-lo en la composició de gotes pel nas o les orelles, en locions netejadores de la boca, en cremes d'afaitar i altres productes amb finalitats no sanitàries. També s'ha utilitzat com a plaguicida i intervé com a matèria primera en la producció de certs preparats farmacèutics com l'aspirina. Per donar una idea de la importància del fenol en la producció industrial podem dir que es troba dins el grup de les 50 substàncies químiques amb més volum de producció als Estats Units (1200 tones l'any 1984) [1,11].

Els **clorofenols** són un grup de compostos químics que tenen la mateixa estructura aromàtica (bàsica) del fenol però on s'ha substituït un o més àtoms d'hidrogen per àtoms de clor. Existeixen cinc tipus bàsics de clorofenols que contenen, respectivament, 1, 2, 3, 4 i 5 àtoms de clor. En total són 19 compostos principals més els fenols cloroderivats i substituïts

amb grups metil i etil, que també s'inclouen dins aquest grup. Són compostos orgànics d'origen principalment sintètic encara que alguns d'ells poden presentar-se de forma natural, com és el cas de certs diclorofenols que s'han detectat en organismes vius (e.g., 2,4-diclorofenol en una espècie de *Penicillium*) [12]. De totes maneres, aquestes fonts naturals poden considerar-se negligibles. Tal com hem dit, doncs, la seva procedència és majoritàriament sintètica, i es formen a través de processos industrials tal com la cloració del fenol o clorofenols de baix grau de cloració a elevada temperatura i amb l'ajuda, en certs casos, de catalitzadors com el iode o els clorurs d'alumini, ferro (III) i antimoni, o bé per mitjà de la hidròlisi alcalina de clorobenzens [13]. Ambdós processos tenen l'inconvenient que originen com a productes secundaris de la formació de clorofenols, i si les condicions òptimes de reacció no es mantenen, altres substàncies que són igualment tòxiques com és el cas de les dibenzodioxines policlorades (PCDDs) i els dibenzofurans policlorats (PCDFs). Els clorofenols també poden originar-se com a conseqüència de l'activitat humana però a través de rutes indirectes. Aquest és el cas de la seva formació com a subproductes en el procés de blanqueig de la polpa de cel·lulosa que condueix a l'obtenció del paper. En aquest procés s'utilitza hipoclorit o clor que pot reaccionar amb residus lignítics per donar lloc als clorofenols [14]. Igualment es poden obtenir de forma espontània durant el procés de cloració de l'aigua a les plantes de tractament d'aigües residuals [15]. El clor, que s'utilitza com a desinfectant, pot reaccionar amb el fenol si les aigües estan contaminades per aquest compost o, en el seu defecte, amb constituents naturals (majoritàriament matèria orgànica) per donar lloc als compostos clorats.

Els clorofenols han estat àmpliament utilitzats a l'agricultura com a plaguicides o com a conservadors de la fusta (especialment el pentaclorofenol) [16]. De totes maneres, el seu ús s'ha anat reduint i restringint en molts països en els darrers anys a mesura que s'han conegut les seves propietats tòxiques. També s'utilitzen certs compostos fenòlics clorats com a intermedis en la producció d'altres plaguicides com l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D) o l'àcid 2,4,5-triclorofenoxiacètic (2,4,5-T) a l'igual que poden trobar-se en el medi ambient com a productes de degradació d'aquests plaguicides [17]. Altres aplicacions dels clorofenols són com a biocides, antisèptics o desinfectants d'ús domèstic, dental, clínic o veterinari, encara que es van reemplaçant per altres substàncies químiques que produeixen el mateix efecte però que no són tan agressives.

Els **nitrofenols**, per la seva banda, són un grup de compostos que no es troben de forma natural en el medi ambient. Els mononitrofenols, compostos que tenen un únic grup nitro, els

trobem en tres formes isomèriques diferents: 2-nitrofenol (*o*-nitrofenol), 3-nitrofenol (*m*-nitrofenol) i 4-nitrofenol (*p*-nitrofenol). De tots tres, els més predominants a la indústria i, consegüentment, al medi ambient són el 2-nitrofenol i el 4-nitrofenol. Els dinitrofenols els podem trobar en sis formes diferents de les quals la més important és el 2,4-dinitrofenol.

Tots ells són compostos manufacturats per l'home. El 2-nitrofenol s'obté bé per hidròlisi catalítica del 2-nitroclorobenzè amb NaOH o per acció de HNO₃ diluït sobre el fenol i posterior destil·lació per arrossegament de vapor per separar-lo del 4-nitrofenol, que també es produeix en aquest procés [18]. El 4-nitrofenol, per la seva banda, es pot obtenir a partir de les mateixes rutes que el seu isòmer però partint, en el primer cas, de 4-nitroclorobenzè.

L'ús que es fa d'aquests compostos també és bàsicament industrial. *o*-nitrofenol s'utilitza com a intermedi per a la producció de tints, pigments, fungicides i també com a indicador àcid-base. *p*-nitrofenol intervé en la manufactura de productes farmacèutics, fungicides, tints i per enfosquir la pell (cuir). El 2,4-nitrofenol, a més d'algunes de les aplicacions citades per als compostos anteriors, també intervé en el procés de conservació de la fusta, la fabricació d'explosius, així com substàncies per al control d'insectes i en el procés de revelat fotogràfic. Antigament s'utilitzava aquest últim per a la producció de pastilles per aprimar però al 1938 es va prohibir la seva comercialització a tal efecte.

Els compostos fenòlics alquil substituïts o **alquilfenols** es produeixen durant l'alquilació del toluè, així com en la combustió i piròlisi de materials que contenen resines fenòliques [19]. Compostos com el nonilfenol o l'octilfenol s'utilitzen majoritàriament en la producció de tensioactius del tipus alquilfenol etoxilats que tenen aplicació a Europa com a detergents industrials o de laboratori (e.g., els usats en la neteja de la llana) o que es troben en algunes formulacions de plaguicides [20].

L'últim grup de derivats fenòlics que s'estudien en aquest treball inclou els **bromofenols** i els **compostos bisfenòlics de tipus A**. Ambdós tipus de compostos sovint s'associen degut a que tenen aplicacions comunes. Els fenols bromats són molècules aromàtiques derivades del fenol on s'han substituït àtoms d'hidrogen per àtoms de brom. Els bisfenols, per la seva banda, són estructures de dos anells de fenol, que poden contenir substitucions de tipus Cl o Br, enllaçades per mitjà d'un grup -C(CH₃)₂. Alguns d'aquests compostos, principalment tetrabromobisfenol A, pentabromofenol, tetraclorobisfenol A i 2,4,6-tribromofenol, tenen la seva aplicació principal com a substàncies retardants de flama [21]. Aquestes substàncies són additius que s'afegeixen a materials orgànics polimèrics

àmpliament utilitzats a la indústria i els confereixen propietats ignífugues. Aquests retardants de flama tenen aplicació en productes de tipus tèxtil, equipament elèctric i electrònic, pintures, polímers, plàstics i espumes de mobiliari, entre altres, i actuen interferint en la combustió dels materials polimèrics als que s'han afegit i que són el component principal dels productes de consum citats anteriorment. El mecanisme d'inhibició de la combustió és bàsicament el mateix, independentment de la naturalesa del retardant: a l'aplicar calor, aquests additius es descomponen abans que la matriu del polímer i són capaços, a través de diferents vies, d'inhibir el procés de combustió [22]. En els compostos ignífugs bromats, la proporció d'àtoms de brom del compost és la responsable de l'activitat inhibidora de la combustió de la molècula ja que aquests àtoms actuen com a substàncies interferents en el mecanisme radicalari que té lloc a la fase gas durant la combustió. Els radicals OH· i H· d'elevada energia formats durant la combustió són desplaçats pels Br alliberats dels compostos retardants de flama [23]. Perquè una substància actuï com un retardant de flama adequat, aquesta ha de descompondre a una temperatura aproximadament 50°C per sota de la del polímer. La majoria dels compostos organobromats posseeixen aquestes propietats tèrmiques degut a que els enllaços C-Br són febles.

Altres aplicacions dels compostos presents en aquest grup són bàsicament industrials. Així, el bisfenol A s'utilitza com a intermedi en la producció d'adhesius, pintures, detergents, conservadors de la fusta i una gran varietat de plàstics.

1.2.2.2 Presència dels compostos fenòlics en el medi ambient

Els compostos fenòlics s'alliberen al medi ambient com a conseqüència del seu ús en processos industrials, així com per la seva presència en productes de consum habitual. La persistència d'aquests compostos en les diferents matrius ambientals (aire, aigua i sòl) i les transformacions que hi pateixen depenen en gran mesura de les propietats físiques i químiques de cada grup de derivats. Així doncs, pel que fa al fenol, les majors emissions es produeixen a l'atmosfera i s'han arribat a trobar nivells de contaminació per a aquest compost de fins a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ en zones urbanes i 200 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ en zones altament industrialitzades. Un cop alliberat a l'aire, el fenol pot ser transportat cap a altres matrius, per exemple a través de l'aigua de pluja; tot i això, el percentatge d'aquest compost que es transporta sol ser sempre inferior al que pateix degradació en el mateix medi. El fenol pot ser transformat fotoquímicament en altres compostos químics com dihidroxibenzens, nitrofenols o productes que passen pel trencament de l'anell aromàtic, en poques hores i per mitjà de reaccions amb radicals OH· o NO₃·. La seva

elevada solubilitat en medi aquós i els valors de coeficient octanol-aigua fan que presenti una gran mobilitat en els sòls i que tingui molta tendència a passar a les aigües, ja siguin superficials o subterrànies. Un cop a l'aigua, pot patir degradació fotoquímica a través de radicals hidroxil i peroxi o pot ser oxidat a CO_2 i CH_4 (s'estima que la velocitat d'aquest procés és d'un 11 % de transformació en 24 hores) així com, en presència de clor, pot transformar-se en clorofenols. L'oxidació a CO_2 i CH_4 també es pot donar per acció de microorganismes, tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques. La velocitat d'aquest procés depèn de diversos factors com la concentració de fenol, la temperatura, la presència de llum, la profunditat si té lloc al sòl, l'abundància de bacteris o la presència d'altres nutrients o contaminants. Aquesta biodegradació pot acomplir-se de forma completa al sòl en 2-5 dies i en menys d'un dia en aigua fresca [10].

Els clorofenols, per la seva banda, els trobem majoritàriament a les aigües i al sòl i en molt poca quantitat a l'aire. L'emissió de clorofenols a l'atmosfera representa únicament un 5 % del total i aquestes emissions en forma de vapor estan relacionades amb les fonts industrials de producció de clorofenols i amb la incineració de residus municipals. Són compostos que pateixen una elevada adsorció en els sòls sobretot si són àcids i tenen un alt contingut en matèria orgànica ja que són capaços de formar enllaços de tipus covalent amb ella [12]. Aquesta adsorció també és més important per als compostos més clorats, al tenir aquests valors de coeficients de partició octanol-aigua més elevats i, consegüentment, un caràcter més lipofílic. Els clorofenols també són adsorbits en els sediments en contacte amb les aigües que els contenen. En aquest cas, el grau d'adsorció depèn no només del caràcter lipofílic de cada compost, sinó que també s'ha de tenir en compte el pH del medi aquàtic i el grau de dissociació de cada clorofenol. El percentatge de dissociació d'un compost està relacionat amb la seva acidesa, així una major acidesa (valor de pK_a més baix) es tradueix en una major dissociació i en consegüència més tendència a romandre en el medi aquàtic [13]. Un cop distribuïts en el medi ambient, a més de patir processos físics tal com evaporació o adsorció, els clorofenols poden ser degradats a altres substàncies per mitjà de reaccions químiques o per acció de la llum o dels microorganismes. Aquestes transformacions poden tenir lloc en temps variables, des de pocs dies fins a varis mesos, i els productes finals més habituals d'aquests processos són CO_2 , H_2O i ions Cl . No obstant, en alguns casos els productes finals no són tan innocus com els citats anteriorment sinó que els clorofenols poden esdevenir substrats per a la formació d'altres compostos més tòxics com les dioxines [24]. Igualment s'ha provat l'emissió de dibenzodioxines o dibenzofurans a l'atmosfera com a conseqüència de la

combustió de fusta tractada amb pentaclorofenol [3]. La degradació dels clorofenols està influenciada per diversos paràmetres com el pH (e.g., la seva fotòlisi és més ràpida en condicions alcalines), la presència o no d'oxigen (la biodegradació disminueix en condicions anaeròbiques), la temperatura, la presència de nutrients inorgànics com fosfats i nitrats o la presència de matèria orgànica (un augment d'aquests tres últims paràmetres es tradueix en un augment de la biodegradació i degradació de clorofenols). També té una gran influència la posició dels substituents clorats a l'anell aromàtic, així, substitucions en *orto* i *meta* són més reactives que en la posició *para*, igual que el nombre de clors és inversament proporcional a la seva reactivitat [12].

Pel que fa als nitrofenols, ja s'ha comentat que no es troben de forma natural en el medi. En funció de quina sigui la forma en què s'alliberin de les indústries aniran a parar a l'aire, a l'aigua o al sòl. Alliberats a l'atmosfera, el temps que romandran aquests compostos a l'aire s'espera que no sigui massa gran, essent major pel 2-nitrofenol degut a que té un valor de pressió de vapor més elevat [25].

Els compostos alquilfenòlics s'alliberen fàcilment a través de la degradació dels tensioactius del tipus alquilfenol etoxilats, dels quals en són precursors. Un cop en el medi poden persistir llargament o concentrar-se en organismes vius com peixos o aus provocant una contaminació en els seus òrgans interns fins a varis milers de cops superior a la del medi circumdant.

Els bromofenols, juntament amb altres compostos retardants de flama, poden alliberar-se al medi ambient durant la seva producció o procedents de la seva lenta evaporació des de materials on es troben presents. Són compostos lipofílics i persistents, per la qual cosa s'adsorbeixen ràpidament a partícules sòlides en sòls i sediments, tendeixen a bioacumular-se i repercuteixen en la cadena alimentària [26].

1.2.2.3 Toxicitat

Són diverses les investigacions que s'han dut a terme per tal de determinar els efectes adversos derivats de l'exposició als compostos fenòlics. Aquests estudis inclouen assaigs sobre animals de laboratori però també estudis sobre la població exposada a aquests compostos. Els assaigs sobre animals de laboratori permeten determinar els valors de LD₅₀ tant per exposició als contaminants per ingestió, inhalació o contacte amb la pell, així com avaluar els seus efectes cancerígens, mutagènics o teratològics. El fenol, per exemple, presenta una toxicitat moderada, amb valors de LD₅₀ calculats sobre rates, ratolins i conills

que oscil·len entre 300 i 600 mg·Kg⁻¹ per via oral i entre 600 i 1400 mg·Kg⁻¹ per via dèrmica [10]. Els clorofenols mostren una toxicitat creixent a l'augmentar el grau de cloració; així el pentaclorofenol és el compost més tòxic amb valors de LD₅₀ entre 27 i 205 mg·Kg⁻¹ (aproximadament 2 grams per a una persona normal) [16]. A més, els derivats amb substitucions clorades a les posicions 3 i 5 de l'anell aromàtic (*meta*-clorofenols) presenten una toxicitat més elevada que la que esperariem només tenint en compte el nombre de clors [12]. Els valors de LD₅₀ per a clorofenols diferents de pentaclorofenol i per ingestió van des de 89 mg·Kg⁻¹ per a 2,3,5,6-tetraclorofenol fins a 2960 mg·Kg⁻¹ per a 2,4,5-triclorofenol i per via dèrmica el rang és de 485 mg·Kg⁻¹ per a 2,3,4,6-tetraclorofenol i 1414 mg·Kg⁻¹ per a 2,4-diclorofenol.

Els nitrofenols presenten toxicitats bastant elevades i són nombrosos els estudis que s'han dut a terme sobre tot tipus d'animals: rates, conills, gossos, coloms, etc. Els mononitrofenols, per exemple, presenten dosis letals sobre animals que van dels 10 als 1700 mg·Kg⁻¹. Es coneixen valors de concentracions que són letals per als humans: a partir de 5 mg·Kg⁻¹ per al cas dels trinitrofenols i de 1 a 3 g per via oral per al 2,4-dinitrofenol [27].

Es tenen dades sobre els mecanismes de toxicitat dels compostos fenòlics. Poden actuar inhibint la fosforilació oxidativa mitocondrial que és un procés bioquímic que condueix a la síntesi d'adenosina trifosfat (ATP) o molècula transportadora de l'energia que necessiten les cèl·lules. La inhibició d'aquest procés provoca una manca d'energia que el cos supleix amb un augment del catabolisme. En aquestes condicions, l'energia produïda durant el catabolisme no es converteix en ATP (recordem que el mecanisme es troba inhibit) sinó que s'allibera en forma de calor, provocant un augment de la respiració, de la temperatura del cos i pèrdues de pes importants a llarg termini [12]. Certs derivats fenòlics també tenen l'habilitat d'augmentar el nombre de neurotransmissors alliberats durant el procés de la sinapsi. Els efectes derivats d'aquest mecanisme són tremolors, convulsions, depressió del sistema nerviós central seguida d'un augment de la respiració, un augment de la pressió sanguínia i una progressiva debilitació muscular [28]. L'exposició per via dèrmica als compostos fenòlics pot provocar danys per acció corrosiva i aquesta acció ha estat atribuïda a una desnaturalització proteica induïda per aquests compostos.

Una particularitat dels compostos fenòlics clorats és que presenten llindars de percepció molt baixos i que, en conseqüència, són detectables fàcilment en aigües i en peix a concentracions de traces (a partir d'1 µg·L⁻¹). Tenint en compte les concentracions de clorofenols necessàries per provocar la mort en animals de laboratori, la mort en humans

exposats a través de la ingestió d'aigua contaminada és improbable ja que els llindars de percepció olfactiva i gustativa d'aquests compostos fan remota la ingestió d'aigües amb altes concentracions pel mal gust i la mala olor que desprenen.

Els estudis duts a terme per avaluar la carcinogènesi dels compostos fenòlics no han resultat en prou evidències per tal de classificar a molts d'aquests compostos com a cancerígens. No obstant això, estudis sobre rates i ratolins han demostrat que el 2,4-diclorofenol pot actuar com a promotor de manifestacions carcinogèniques i l'EPA classifica el 2,4,6-triclorofenol com un agent B2. Aquesta categoria s'aplica a tota substància química de la que es tenen suficients evidències de la seva carcinogènesi sobre animals i indicis encara no prou adequats per assegurar-ho en humans [12]. El pentaclorofenol pot presentar efectes tòxics sobre el fetus si s'administra a femelles embarassades però no han estat encara provats els seus efectes teratològics [16].

Si ens fixem ara en els derivats fenòlics bromosubstituïts, no es coneix amb massa exactitud l'impacte i els efectes adversos que causen sobre la salut i el medi ambient, però la toxicitat de la majoria d'aquestes substàncies sembla ser petita. Així, per exemple, el valor de LD₅₀ oral per a tetrabromobisfenol A és $> 2 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en ratolins [29]. Malgrat això, aquest compost, juntament amb altres del mateix grup com el bisfenol A i el tetraclorobisfenol A, es relacionen estructuralment amb hormones com el 17 β -estradiol o la tirosina i es sospita de la seva toxicitat en la funció tiroïdal, per la qual cosa es poden considerar com a potencials disruptors endocrins [30]. Aquest comportament també ha estat provat per al cas d'alguns compostos alquilfenòlics. Al 1930 es va descobrir per primera vegada l'efecte de certs alquilfenols com a disruptors endocrins, concretament com a substàncies capaces de comportar-se com a estrògens, les hormones que influeixen el desenvolupament i manteniment de les característiques sexuals femenines així com la maduració i funció dels òrgans sexuals. Els compostos químics que presenten aquest comportament poden actuar per diferents vies que inclouen la imitació d'hormones, el bloqueig de la seva acció o l'acceleració del seu deteriorament [20]. Alguns valors de LD₅₀ determinats per a compostos alquilfenòlics oscil·len entre 300 i 730 mg·Kg⁻¹ en rates i 700 i 1300 mg·Kg⁻¹ en conills [31].

1.2.2.4 Regulacions

La creixent producció i utilització dels compostos fenòlics i la preocupació pels seus efectes tòxics va forçar els organismes oficials a regular les concentracions màximes

admissibles d'aquests compostos en el medi ambient, especialment a les aigües superficials i subterrànies, que són les que s'utilitzen en l'abastament per al consum humà.

Pel que respecta a la Unió Europea, aquesta estableix dos tipus de regulacions en relació a la qualitat de les aigües, les que llisten les substàncies perilloses que cal eliminar de les descàrregues al medi ambient o marquen les mesures que cal prendre per conservar en bon estat el medi aquàtic, i les que, a més, estableixen valors guia o màxims permesos per a aquestes substàncies. En referència a les aigües destinades al consum humà, la Directiva 75/440/EC classifica les aigües superficials en tres tipus en funció del tractament requerit per a la seva potabilització i estableix valors màxims de concentració per a fenols per a aquests tres grups d'entre 1 i 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquesta regulació va ser recollida en el Reial Decret 1541/1994 del 8 de juliol (BOE del 28 de juliol de 1994). Per altra banda, la Directiva 80/778/EC legisla que la màxima concentració admissible (MAC) de fenols en aigua de beguda no pot superar els 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ com a concentració de fenols total i estableix 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ com la concentració màxima individual de cada compost. Aquesta última regulació es va modificar per la Directiva 98/83/EC la qual, però, no contempla cap canvi en relació a la legislació referida a les substàncies fenòliques. Pel que respecta a les aigües destinades al bany, el valor màxim permès per a fenols és de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, segons la Directiva 76/160/EC (Reial Decret 734/1988 de l'1 de juliol). Per al pentaclorofenol, que és el compost considerat més tòxic de tota la gamma de fenòlics, la legislació és menys permissiva; així doncs, segons la Directiva 91/173/EC, no és permesa la comercialització de substàncies o preparats que continguin més d'un 0.1 % en massa d'aquest compost o d'alguna de les seves sals. Pel que fa als Estats Units, l'Agència de Protecció del Medi Ambient (EPA) és menys restrictiva en les regulacions aplicables per a pentaclorofenol. Així, estableix que la màxima concentració d'aquesta substància permesa en aigua de consum (*Maximum Contaminant Level*, MCL) és de 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ però posa a zero la concentració per sota de la qual no es coneix que hi hagi risc per a la salut (*Maximum Contaminant Level Goal*, MCLG). L'any 1979, l'EPA elaborà una llista de 115 compostos anomenats contaminants prioritars sospitosos de produir efectes nocius en la salut i que a més podien trobar-se en quantitats importants en l'aigua. Entre aquests compostos es troben 11 fenols: fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4-dimetilfenol, 2,4-dinitrofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4,6-triclorofenol, 4-nitrofenol, 2-metil-4,6-dinitrofenol i pentaclorofenol [32]. Aquests 11 compostos fenòlics són els anàlits que s'estudien en gran part d'aquesta memòria, on es desenvolupen mètodes per tal de quantificar-los en matrius aquoses (**capítol 2**) i sòls (**capítol 4**).

Una altra organització que ha suggerit valors de concentració guia per a alguns compostos fenòlics és l'organització mundial de la salut (*World Health Organisation*, WHO). Aquests valors es recullen a la **Taula 1.4** [33]

| Compost | Valor |
|---------------------|-------------------------------------|
| 2-clorofenol | 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 2,4-diclorofenol | 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 2,4,6-triclorofenol | 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| pentaclorofenol | 9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |

Taula 1.4 Valors màxims de concentració per a alguns fenols recomanats per l'Organització Mundial de la Salut.

Als Estats Units, a més de l'EPA, també existeixen altres organitzacions que desenvolupen regulacions i recomanacions pel que fa als nivells de compostos fenòlics que es poden tolerar sense que apareguin efectes adversos sobre la salut pública. Algunes d'aquestes agències són: *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA), *Food and Drug Administration* (FDA), *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), i *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH). Aquestes agències estableixen, a l'igual que les Directives de la Unió Europea, concentracions màxims admissibles de fenols en aigües en funció del seu ús, però també valors màxims que poden tolerar treballadors exposats al contacte amb aquests compostos o llimdars de percepció en aire i aigua.

1.3 ANÀLISI DE COMPOSTOS FENÒLICS

L'increment del grau de contaminació ambiental com a resultat de l'activitat humana i industrial ha provocat una creixent preocupació, per part dels organismes competents, pel destí i els efectes derivats de l'acumulació de substàncies tòxiques en el medi. Aquesta preocupació s'ha traduït, tal com ja hem vist a l'apartat anterior, en l'establiment de mesures legislatives que determinen les màximes concentracions de substàncies contaminants que poden estar presents a les diferents matrius ambientals i que, en la majoria de casos, són nivells traça. Aquesta legislació tan restrictiva ha provocat el desenvolupament de mètodes analítics prou sensibles que permetin detectar totes aquestes substàncies per sota dels nivells exigits. En molts casos, però, els sistemes de detecció convencionals no assoleixen els límits

de detecció requerits per la qual cosa és necessària la introducció d'etapes de preconcentració en el procés analític, tal com veurem més endavant.

Pel que fa a l'anàlisi de compostos fenòlics, són nombrosos els estudis en què es proposen mètodes analítics per a la seva determinació en tot tipus de matrius, els quals s'han recollit en diversos treballs [34,35]. Un dels primers mètodes existents per a l'anàlisi de fenols és un mètode colorimètric basat en la reacció del fenol amb 4-aminoantipirina en presència d'hexacianoferrur de potassi en medi alcalí per donar lloc a un complex acolorit que es determina a 460 o 500 nm en funció del medi final [36]. La 4-aminoantipirina pot reaccionar amb derivats fenòlics *orto* i *meta* substituïts i, si les condicions de pH són adients, també amb *para*-fenols quan les substitucions són de tipus carboxil, halogen o àcid sulfònic. No obstant això, aquest mètode no és capaç de diferenciar entre els diferents tipus de fenols substituïts sinó que només proporciona una concentració total dels compostos presents expressada com a contingut de fenol (índex fenòlic). El mètode presenta diverses variants en funció de quins siguin els nivells de concentració de fenols presents i el tipus d'interferències. Així, per aconseguir una major sensibilitat, es recomana dur a terme una extracció del complex acolorit en medi cloroform i mesurar l'absorbància a 460 nm (amb aquestes condicions és possible la detecció de fins a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [37]. Aquest mètode, tot i que no permet la quantificació dels diferents tipus de compostos, és encara utilitzat quan es vol determinar la contaminació fenòlica total d'una aigua i, recentment, Lupetti et al. [38] han proposat una variació, basada en un sistema de flux en continu, que permet assolir límits de detecció de l'ordre dels del mètode oficial ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) però reduint el nombre d'etapes implicades i minimitzant el consum de reactius.

L'aparició de les tècniques cromatogràfiques va suposar un gran avenç en l'anàlisi de compostos orgànics presents en mostres ambientals. Pel que fa a l'anàlisi de derivats fenòlics, l'auge de la cromatografia va portar a l'aparició dels primers mètodes capaços de separar i quantificar els derivats de forma individualitzada. A partir d'aquest moment, la majoria de mètodes proposats per a l'anàlisi de fenols es basen en aquest tipus de tècniques, tant en la variant de cromatografia de gasos com de cromatografia líquida. No obstant això, tot i que la major part de mètodes són cromatogràfics, també s'han descrit metodologies basades en noves tècniques com l'electroforesi capil·lar o les tècniques d'immunoassaig.

1.3.1 SISTEMES DE SEPARACIÓ I DETECCIÓ

1.3.1.1 Mètodes cromatogràfics

1.3.1.1.1 Cromatografia de Gasos (GC)

La cromatografia de gasos és una tècnica de separació basada en la distribució dels anàlits entre una fase estacionària, que en la majoria dels casos és un líquid orgànic poc volàtil disposat sobre la superfície interna d'un sòlid (generalment sílice), i una fase mòbil gasosa. Aquesta tècnica s'aplica, majoritàriament, a l'anàlisi de compostos orgànics volàtils i termostables. Els compostos fenòlics, per les seves propietats físiques, són anàlits que poden ser analitzats per aquesta tècnica. De fet, tots els mètodes oficials de determinació de fenols estan basats en la cromatografia de gasos. El mètode 604 de l'EPA per a la determinació de fenols [39] recomana la quantificació dels 11 compostos fenòlics considerats com a contaminants prioritaris mitjançant detecció per fotoionització de flama (FID) sense derivatització prèvia o bé per mitjà d'un detector de captura d'electrons (ECD) prèvia formació dels derivats pentafluorobenzoats. En tots dos casos té lloc una preconcentració de la mostra aquosa per extracció líquid-líquid (LLE). Els límits de detecció assolits per aquests dos mètodes es recullen a la **Taula 1.5**. Tal com podem veure, la detecció per ECD permet reduir els límits de detecció per alguns compostos. El tipus de detector emprat és un dels paràmetres instrumentals que ens condiciona els límits de detecció que es poden assolir.

Els detectors més utilitzats per a la determinació de compostos fenòlics per cromatografia de gasos són el detector de fotoionització de flama (FID) [40-42], el detector de captura d'electrons (ECD) [43,44] i el detector d'emissió atòmica amb plasma (AED) [45], adients per a la detecció de substàncies halogenades, i l'espectròmetre de masses [46-48]. Aquest últim detector té la particularitat que fa possible la identificació dels compostos analitzats a més de dur-ne a terme la quantificació i permet reduir en gran mesura els límits de detecció obtinguts en el cas de l'acoblament MS/MS en tàndem (aquest acoblament s'explicarà més extensament en el **Capítol 3**). La EPA recull aquesta tècnica en el seu mètode 625 [49], els límits de detecció del qual també es recullen a la **Taula 1.5**, i en el mètode 8270 [50] on també s'inclouen alguns dels compostos fenòlics. Altres sistemes de detecció aplicats a la determinació de fenols per cromatografia de gasos són l'espectroscòpia d'emissió atòmica per plasma induïda per microones (AED) [51,52] i l'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier [53]. Un altre mètode oficial per a l'anàlisi de fenols és el mètode 8041 [54], que és equivalent al mètode 604 però on s'augmenta el nombre de fenols estudiats i on

s'especifiquen, a més de les característiques del mètode cromatogràfic, les tècniques i condicions de preparació de mostra més adients en funció del tipus de matriu (aigua o mostres sòlides).

| Compost | US EPA 604 | US EPA 604 | US EPA 625 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|
| | GC-FID | GC-ECD | GC-MS |
| 2-clorofenol | 0.31 | 0.58 | 3.3 |
| 2-nitrofenol | 0.45 | 0.77 | 3.6 |
| fenol | 0.14 | 2.2 | 1.5 |
| 2,4-dimetilfenol | 0.32 | 0.63 | 2.7 |
| 2,4-diclorofenol | 0.39 | 0.68 | 2.7 |
| 2,4,6-triclorofenol | 0.64 | 0.58 | 2.7 |
| 4-cloro-3-metilfenol | 0.36 | 1.8 | 3.0 |
| 2,4-dinitrofenol | 13.0 | -- | 42.0 |
| 2-metil-4,6-dinitrofenol | 16.0 | -- | 24.0 |
| pentaclorofenol | 7.4 | 0.59 | 3.6 |
| 4-nitrofenol | 2.8 | 0.70 | 2.4 |

Taula 1.5 Límits de detecció ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dels mètodes 604 i 625 de la EPA assolits amb diferents detectors.

Els mètodes basats en la cromatografia de gasos són, en general, més sensibles que els que utilitzen la cromatografia líquida. Malgrat això, la primera tècnica requereix una derivatització prèvia dels anàlits sobretot quan aquests presenten una elevada polaritat com és el cas dels compostos fenòlics. La separació i detecció de fenols per GC sense prèvia derivatització és complicada i precisa de columnes capil·lars altament desactivades per tal d'evitar les cues de pic i millorar les característiques cromatogràfiques [55]. La derivatització dels compostos fenòlics per tal de formar substàncies menys polars i, en conseqüència, més fàcilment quantificables per GC, es pot dur a terme amb un gran nombre de reactius dels quals es parlarà amb més detall en el **Capítol 3** d'aquesta memòria. La necessitat d'introduir etapes de derivatització és la raó per la qual la tendència actual en l'anàlisi de fenols és la de reemplaçar les tècniques de gasos per aquelles basades en la cromatografia líquida en la que aquest pas previ no és tan imprescindible, tal com veurem. La introducció d'una nova etapa en el procés analític suposa un increment del temps d'anàlisi així com una nova font d'errors.

1.3.1.1.2 Cromatografia líquida (LC o HPLC)

La cromatografia líquida és un procés anàleg a la cromatografia de gasos amb la diferència que la fase mòbil que transporta els anàlits a través de la fase estacionària és una mescla líquida. És una tècnica complementària a la cromatografia en fase gasosa ja que permet l'anàlisi de compostos làbils, no volàtils i de polaritat alta.

En el cas de la determinació de compostos fenòlics, la cromatografia líquida és l'opció més escollida degut a que no és necessària la derivatització prèvia dels anàlits al presentar grups conjugats que fan viable la seva detecció directa emprant un detector ultraviolat-visible (UV-Vis), el detector més habitual en LC. És una tècnica en què l'acoblament *on-line* de la mateixa amb els processos de preconcentració i *clean-up* més habituals és relativament senzill, fet que no passa amb la cromatografia de gasos.

Tot i que la derivatització no és un pas indispensable en cromatografia líquida, aquesta es pot aplicar en alguns casos, tant en el mode precolumna com postcolumna. Aplicada a l'anàlisi de fenols, aquesta derivatització ha servit per millorar la resposta i sensibilitat en espectrometria de masses [56] o sobretot per aquells casos en què s'aplica la detecció per fluorescència dels derivats, mètode que permet disminuir en gran mesura els límits de detecció. Són pocs els derivats fenòlics que exhibeixen propietats fluorescents per la qual cosa és necessària la seva derivatització o l'aplicació de mètodes de fluorescència indirecta en els quals s'afegeix un agent fluorescent a la fase mòbil que proporciona un senyal de fons constant. Alguns exemples de mètodes que utilitzen la fluorescència amb derivatització prèvia dels fenols es recullen a la **Taula 1.6**.

| Agent derivatitzant | Mode | Matriu | Ref. |
|---|-------------|-------------------|------|
| clorur de 4-(4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)benzoïl | precolumna | orina | [57] |
| <i>N</i> -metilbenzotiazole-2-hidrazona i $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_3$ | postcolumna | aigua residual | [58] |
| clorur de 5-(dimetilamino)naftalen-1-sulforil | precolumna | aigua superficial | [59] |
| 4-aminoantipirina i $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ | postcolumna | aigua residual | [60] |
| cloroformiat de 2-(9-antrietil) | precolumna | aigua residual | [61] |

Taula 1.6 Agents derivatitzants que s'han utilitzat per a l'anàlisi de fenols mitjançant cromatografia líquida i detecció per fluorescència.

Els mètodes de detecció més habituals per a cromatografia líquida aplicada a l'anàlisi de compostos fenòlics són l'absorció ultraviolat-visible (UV-Vis) [62-67], la detecció

electroquímica o amperomètrica (ED) [68-72], la fluorescència (FD) amb detecció directa [57,73] o indirecta [74], i l'espectrometria de masses (MS) [75-79]. Pel que fa als límits de detecció assolits per a cadascuna de les metodologies anteriors, el detector electroquímic i el fluorímetre permeten reduir-los en gran mesura respecte l'ultraviolat-visible. Així, per exemple, Puig et al. [80] obtenen límits de detecció per a compostos fenòlics en aigües que van de 0.5 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per UV-Vis i de 0.01 a 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per ED en les mateixes condicions de preconcentració prèvia. Malgrat les grans millores en sensibilitat, el detector electroquímic és molt sensible a la presència d'impureses a les mostres, les quals es dipositen sobre l'elèctrode i provoquen caigudes dràstiques de sensibilitat. Per tant, és necessari el manteniment periòdic de l'instrument [81]. A més, el detector electroquímic és molt susceptible a la composició de la fase mòbil pel que es prefereixen els mètodes isocràtics sobre els que utilitzen gradient per tal de reduir distorsions en la línia base o temps llargs d'estabilització del sistema [69]. Dupeyron et al. [82] comparen la detecció per UV-Vis amb la detecció FD per a fenol i obtenen límits de detecció i quantificació del mètode cromatogràfic de 0.36 i 24 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivament pel primer cas i de 0.014 i 0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pel segon cas. L'espectrometria de masses comporta un avantatge afegit respecte a la resta de sistemes de detecció com és la possibilitat d'identificar els anàlits presents en una mostra per comparació de l'espectre d'aquests amb llibreries. L'acoblament LC-MS és relativament modern i en un principi va comportar problemes pel que respecta al disseny que havien de tenir les interfases. No obstant això, la tècnica ha experimentat un reconeixement molt important en els darrers anys i ara s'aplica satisfactòriament en molts camps de l'anàlisi [83]. Per exemple, Rodríguez-Mozaz et al. [84] l'apliquen simultàniament a la determinació d'estrògens, plaguicides i bisfenol A en aigües naturals. Els límits de detecció obtinguts per a l'anàlisi de 14 compostos fenòlics mitjançant LC-MS, després de la preconcentració de 50-100 mL d'aigua per SPE *on-line*, són de 0.1-5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i 0.1-25 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ per a *full-scan* (SCAN) i *single-ion monitoring* (SIM) respectivament [75]. També és possible, tal com ja veïem en cromatografia de gasos, acoblar les tècniques LC amb dos analitzadors MS en tàndem (LC-MS-MS). Aquest acoblament és molt útil en el monitoratge de mostres complexes i s'ha aplicat amb bons resultats a l'anàlisi de fenols naturals en mostres de carxofes [7] i residus de poma [85].

Innovacions respecte a la cromatografia líquida convencional són les que introdueixen els mètodes que incorporen l'ús de columnes capil·lars. La utilització d'aquest tipus de columnes permet reduir el consum de dissolvents orgànics, precisen de la injecció de volums més petits de mostra i l'acoblament micro-LC-MS es veu afavorit ja que s'utilitzen fluxos de

fase mòbil de l'ordre dels $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ [86]. Una altra variant de la LC és la que aporta l'ús de fases mòbils supercrítiques (SFC) les quals permeten, sota les condicions de pressió i temperatura adients, augmentar la resolució del sistema cromatogràfic. Un mètode que aplica aquesta última tècnica a l'anàlisi de compostos fenòlics presents en aigües és el proposat per Yang et al. [87] el qual utilitza aigua supercrítica com a fase mòbil. La separació de 5 compostos nitrofenòlics per cromatografia líquida capil·lar és possible en el treball publicat per Zhu et al. [88].

1.3.1.2 Mètodes no cromatogràfics

1.3.1.2.1 Electroforesi capil·lar (CE)

L'electroforesi capil·lar és una tècnica de separació que es basa en el moviment d'espècies carregades elèctricament a través d'un medi electroforètic sota la influència d'un camp elèctric. Tot i que en un principi l'electroforesi capil·lar fou una tècnica més decantada cap a l'anàlisi bioquímica, ràpidament es va demostrar la seva aplicabilitat a l'anàlisi ambiental. Dels diferents modes de treball que presenta la CE, els més habituals per a l'anàlisi de compostos fenòlics són l'electroforesi capil·lar en zona (CZE), la micel·lar (MEKC) i l'electrocromatografia (CEC). La CZE és la tècnica més simple i també la més utilitzada tant en medi aquós [89] com en medi orgànic [90]. En aquest últim cas, és necessària l'addició d'anions a la solució electrolítica per tal que sigui possible la formació de complexos heteroconjugats carregats dels anàlits. En aquest sentit, Porras et al. [91] estudiaren l'addició de diferents anions (clorur, bromur, acetat, perclorat i bimalonat) en la separació de fenols metilsubstituïts en medi acetonitril.

Un dels inconvenients d'aquesta tècnica és que els detectors UV-Vis, els més habitualment utilitzats en l'anàlisi de fenols per CE, proporcionen límits de detecció de l'ordre dels $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (majors que en LC) donat que els volums de mostra que s'injecten són petits (nL). Així, per exemple, Kronholm et al. [92] determinen límits de detecció per a fenol, 3-metilfenol, 4-cloro-3-metilfenol i 3,4-diclorofenol de 67, 107, 176 i 282 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivament, en alguns casos fins a 6 cops superiors als obtinguts per GC-MS (mode SCAN) en les mateixes condicions. Aquests valors són insuficients per tal de dur a terme l'anàlisi de mostres ambientals en les quals els contaminants en general, i els fenols en particular, es solen trobar a nivells de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ o inferiors. Aquesta inconveniència es pot resoldre mitjançant l'aplicació d'etapes prèvies de preconcentració o bé amb l'acoblament de

mètodes de detecció més sensibles (electroquímica o fluorescència) a la separació electroforètica [93]. D'altra banda, també és possible dur a terme una concentració de la mostra entre la seva injecció al sistema i la seva detecció per mitjà del que s'anomenen tècniques de *stacking*, que consisteixen en injectar els anàlits dissolts en una solució de menor conductivitat que la solució emprada com a electròlit. D'aquesta manera, a l'aplicar el potencial, s'aconsegueix que els diferents ions que componen la mostra siguin accelerats o frenats fins aconseguir bandes estretes i contigües de cada un d'ells i que es desplacen a la mateixa velocitat [94]. Per mitjà d'aquesta concentració, Morales et al. [95] aconseguixen reduir els límits de detecció de 23 derivats fenòlics de 10 a 400 vegades en l'anàlisi per electroforesi capil·lar en zona.

La cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC) consisteix en l'addició de tensioactius iònics al medi electroforètic que condueixen a la formació de micel·les que actuen com una pseudo-fase estacionària. D'aquesta manera s'aconsegueixen separar anàlits carregats i també neutres. Zemmann et al. [96] apliquen aquesta tècnica a l'anàlisi de 33 compostos fenòlics utilitzant bromur de cetiltrimetilamoni (CTAB) per a la formació de micel·les. L'electrocromatografia capil·lar (CEC) combina els avantatges de l'electroforesi amb els de la LC i també s'ha aplicat a l'anàlisi de derivats fenòlics [97]. Les tècniques electroforètiques, en totes les seves variants, també s'han aplicat de forma satisfactòria a l'anàlisi de certs compostos fenòlics naturals en mostres de vi [98,99]

1.3.1.2.2 Altres mètodes d'anàlisi

Tot i que les tècniques cromatogràfiques representen un percentatge majoritari del total de mètodes desenvolupats per a l'anàlisi de compostos fenòlics, les tècniques d'immunoassaig o l'ús de sensors o biosensors també s'han aplicat a la determinació d'aquests compostos. Així, per exemple, el mètode 4010 de la EPA [100] presenta una metodologia basada en immunoassaig i que fa ús d'un kit comercial per a la determinació de pentaclorofenol en mostres aquoses i sòlides. Aquest tipus de tècniques també s'han aplicat a la determinació de 4-nitrofenol i 4-nitrofenols substituïts [55]. Alguns exemples que demostren l'ús de sensors i biosensors són els treballs presentats per Freire et al. [101] i Campuzano et al. [102].

1.3.2 MÈTODES DE PRECONCENTRACIÓ

El desenvolupament d'un mètode analític implica diferents etapes des de la presa de mostra i el seu tractament fins a la detecció dels anàlits d'interès. Els sistemes de preparació de les mostres han anat, durant molts anys, a l'ombra de les tècniques instrumentals, com a una part inevitable del procés analític, fins que es va prendre consciència de que era una part important per poder obtenir resultats fidedignes al final de l'anàlisi. S'ha estimat que, del temps total de l'anàlisi, dos terços corresponen a la preparació i pretractament de la mostra abans de la determinació final i, a més, és en aquestes etapes on es troben les principals fonts d'error.

La preconcentració dels anàlits és necessària quan la seva concentració és baixa o quan el volum de la mostra que pot ser introduït al sistema d'anàlisi és petit. D'aquesta manera es poden superar els límits dels sistemes de detecció. Una altra etapa important sol ser la purificació de la mostra (*clean-up*) que s'ha de dur a terme quan cal eliminar compostos que poden interferir en la detecció dels anàlits d'interès (e.g., si les interferències i els anàlits es coelueixen i es detecten a la mateixa longitud d'ona en un detector UV-Vis) o per eliminar compostos que poden afectar el funcionament de l'instrument. Els anàlits han d'estar dissolts en un solvent que sigui compatible amb el sistema de mesura, és a dir, en cromatografia de gasos el dissolvent ha de ser volàtil i en cromatografia líquida ha de ser miscible amb la fase mòbil.

Alguns dels mètodes proposats per al pretractament de mostra són tediosos ja que es basen en procediments manuals i llargs. No obstant això, alguns d'aquests s'han anat substituint i la tendència actual és desenvolupar noves metodologies cada cop més ràpides, que comportin menys manipulació de les mostres, de fàcil acoblament als sistemes cromatogràfics i electroforètics i en les quals el consum de dissolvents cars i tòxics es redueixi a la mínima expressió. Els mètodes de preconcentració més habituals per a compostos fenòlics són l'extracció líquid-líquid (LLE) i l'extracció en fase sòlida (SPE), tot i que s'han desenvolupat altres metodologies com la microextracció en fase sòlida (SPME) o aquelles que es basen en la utilització de membranes amb diferents configuracions. En el cas de les mostres aquoses, la majoria d'aquestes tècniques s'utilitzen com a mitjà d'extracció i preconcentració en un sol pas, en canvi, pel que respecta a l'anàlisi de mostres sòlides, aquestes només representen preconcentració i/o *clean-up* i és necessària una extracció prèvia que permeti el pas dels anàlits del sòlid a un extracte líquid. Els processos d'extracció de

mostres sòlides més habituals es discutiran àmpliament en el **Capítol 4** de la present memòria.

L'**extracció líquid-líquid** es basa en la distribució dels compostos orgànics entre la mostra aquosa i un dissolvent orgànic immiscible. El pas clau per tal que el procés LLE sigui eficaç és l'elecció d'un solvent extractant adequat per a cada tipus d'anàlit. Aquest ha de procurar que les substàncies analitzades tinguin una major afinitat per ell que per la solució aquosa. Aquesta tècnica presenta l'avantatge que existeix una gran varietat de dissolvents orgànics i, per tant, el fet de trobar-ne un d'adient per a cada compost en qüestió és relativament senzill. Per altra banda, per augmentar l'eficàcia de l'extracció, sovint és necessari repetir-la dos o tres cops amb un volum de solvent nou cada vegada. Aquesta circumstància, juntament amb el fet que el volum de solvent orgànic posat en contacte amb la mostra aquosa (normalment 1-2 L) no pot ser molt petit perquè es pugui donar la separació de fases, fan que calgui aplicar una etapa d'evaporació després de l'extracció per tal d'aconseguir preconcentració dels anàlits. Com a altres avantatges d'aquesta tècnica podem esmentar la seva simplicitat i que l'utilitatge que es requereix és senzill i econòmic. Aquest fet provoca que fos un dels primers processos a aparèixer i àmpliament utilitzat per a molts tipus de compostos i encara és tècnica estàndard en multitud de mètodes oficials d'anàlisi de contaminants i també concretament de fenols [39]. No obstant això, el nombre d'inconvenients associats a la LLE és superior al de les seves avantatges: utilitza grans volums de dissolvents orgànics, molts d'ells també tòxics, que passen a generar grans volums de residus, en alguns casos la separació de fases pot arribar a ser molt complicada degut a la formació d'emulsions o terceres fases, es poden produir fàcilment pèrdues tant durant les etapes de transferència com d'evaporació, és un procés que difícilment es pot automatitzar i no és aplicable a compostos molt polars i altament solubles en aigua. Alguns exemples d'extracció líquid-líquid aplicada a l'anàlisi de compostos fenòlics utilitzen diclorometà [33,103], hexà [104] o derivatització dels fenols a la mostra original amb clorur de benzoïl i posterior extracció amb èter dietílic [105]. Per mitjà de la derivatització prèvia dels anàlits es pot aconseguir formar compostos menys hidrofílics que tinguin encara més afinitat per la fase orgànica. Fins ara s'han descrit processos líquid-líquid convencionals però Bagheri et al. [106] apliquen una variant del procés en la qual la mostra aquosa (normalment 1 mL) es posa en contacte amb una gota (0.5-2.5 µL) de solvent orgànic disposada a la punta d'una xeringa de 10 µL que es submergeix a uns 0.5 cm de la superfície de la mostra, la qual conté els compostos fenòlics acetilats. Passat un temps de contacte de 10 minuts, la xeringa es retira de

la mostra i la solució orgànica s'injecta al cromatògraf de gasos. D'aquesta manera s'evita el consum de grans volums de solvents orgànics i la necessitat d'evaporar la fase orgànica un cop realitzada l'extracció. Recentment, Yang et al. [107] han desenvolupat, de forma satisfactòria, un mètode LLE per a l'anàlisi d'un gran nombre de contaminants orgànics entre els quals es troben nou fenols, basat en la partició dels anàlits entre una fase aquosa i butà condensat. Gasos com el propà o el butà, un cop líquats, presenten una baixa toxicitat i propietats físico-químiques que els fan ideals per ser aplicats a tal efecte.

Una alternativa a l'extracció líquid-líquid tradicional és la preconcentració mitjançant **membranes líquides**. El sistema consisteix en una fase aquosa anomenada solució de càrrega on inicialment hi són presents les espècies químiques que cal transportar i una segona fase aquosa, receptora o de retroextracció, on es recuperen els anàlits després del seu transport a través d'una dissolució orgànica impregnada en un suport polimèric, que és la membrana pròpiament dita. El procés de transport és normalment conduït per gradient de pH entre les dues fases aquoses. En essència es pot dir que és una tècnica que combina dues extraccions líquid-líquid en un sol pas.

Les membranes líquides s'han aplicat a l'anàlisi de compostos fenòlics fent ús de diferents configuracions i geometries: membranes laminars [108] (el tipus de cel·la utilitzat en aquest cas no permet preconcentració dels anàlits degut a que s'utilitzen volums iguals de solució de càrrega i solució receptora), geometria de fibra buida (*hollow fiber*) [88] i un nou sistema de membranes laminars però en el que l'extracció té lloc en continu i acoblada *on-line* al sistema de detecció cromatogràfic [109].

La tendència actual en la preconcentració i purificació de mostres ambientals és la utilització de l'**extracció en fase sòlida** o extracció sòlid-líquid (SPE). La SPE és una tècnica de preparació de mostra que permet la concentració i purificació dels anàlits presents en una solució mitjançant la seva adsorció en una fase sòlida disposada dins un cartutx o en forma de disc seguida de la seva elució amb un solvent apropiat per a l'anàlisi instrumental. En general, el volum necessari per aconseguir l'elució dels anàlits és molt inferior al volum de mostra aplicat i d'aquesta manera s'aconsegueixen factors de concentració elevats. Tot i que l'extracció en fase sòlida es desenvoluparà més extensament en el **Capítol 2**, podem dir que algunes de les avantatges que proporciona respecte la LLE són l'ús mínim de dissolvents orgànics, les elevades recuperacions i factors de concentració obtinguts, la seva gran versatilitat i aplicabilitat degut al gran nombre de fases sòlides existents i la facilitat d'automatització i acoblament en línia amb les tècniques cromatogràfiques.

La **microextracció en fase sòlida** (SPME) és una variació de la SPE en la que la fase sòlida adsorbent es troba com a recobriment sobre una fibra de sílice fosa de les dimensions de la part interior d'una agulla de xeringa. La fibra es posa en contacte amb la mostra, ja sigui per immersió o per contacte amb l'espai en cap del vial que la conté en el cas de l'extracció d'anàlits volàtils i aquests interaccionen amb el recobriment de la fibra i hi queden atrapats. La desorció pot tenir lloc tèrmicament o emprant un dissolvent orgànic.

La SPME també s'ha aplicat a l'extracció i preconcentració de derivats fenòlics amb diferents tipus de fibres aconseguint recuperacions quantitatives i límits de detecció de l'ordre dels $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. És útil per a la determinació de fenols en aigües [72,110-112], aigües residuals de matriu complexa amb alts nivells de contingut orgànic [113] i sòls [42,114,115]. Una modificació respecte la SPME convencional és la que aporta la utilització d'una nova geometria en la que la fibra es troba recobrint una barra agitadora que es col·loca a l'interior de la mostra. Aquesta variant s'ha aplicat a l'anàlisi de fenols presents en aigües naturals [116] i en vi [117].

Altres mètodes minoritaris de preconcentració de fenols existents a la bibliografia són els que utilitzen diferents tipus de membranes per tal de que hi tingui lloc l'adsorció dels derivats i posterior desorció en un solvent adient. Aquestes membranes, que en la major part dels casos són de poliuretà, poden usar-se en format de petites boles que es posen en contacte amb la mostra a extreure [118] o com a làmines que es col·loquen com a recobriment del tap del vial que conté la mostra, el qual s'inverteix per tal de posar les dues fases en contacte [119].

1.4 REFERÈNCIES

1. B.J. Alloway, D.C. Ayres, *Chemical principles of environmental pollution*, Blackie Academic & Professional, Londres (Regne Unit) (1993), ISBN 0-7514-0013-0.
2. C. Orozco, A. Pérez, M.N. González, F.J. Rodríguez, J.M. Alfayate, *Contaminación ambiental. Una visión desde la química*, Paraninfo S.A., Madrid (Espanya) (2003), ISBN 84-9732-178-2.
3. D.W. Connell, *Basic concepts of environmental chemistry*, Lewis Publishers, Boca Raton (Estats Units) (1997), ISBN 0873719980.
4. J.B. Harbone (ed.), *Plant phenolics*, London Academic Press, Londres (Regne Unit) (1993), ISBN 0-12-461011-0.
5. <http://www.u-bordeaux1.fr/lcsv/SASN/polyphenols.html> (consultada el 22/06/04)
6. C. Andrés-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventós, O. Jáuregui, I. Casals, M. Izquierdo-Pulido, J. Permanyer, LC·GC Europe (2000).
7. F. Sánchez-Rabaneda, O. Jáuregui, R.M. Lamuela-Raventós, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, *J. Chromatogr. A* 1008 (2003) 57.
8. <http://www.originolives.com.au/health/default.asp?title=5> (consultada el 22/06/04)
9. A. Bendini, M. Bonoli, L. Cerretani, B. Biguzzi, G. Lercker, T.G. Toschi, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 425.
10. WHO, *Environmental Health Criteria 161, Phenol*, World Health Organization, Ginebra (Suïssa) (1994), ISBN 92-4-157161-6.
11. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/phs8920.html> (consultada el 08/07/04)
12. WHO, *Environmental Health Criteria 93, Chlorophenols other than pentachlorophenol*, World Health Organization, Ginebra (Suïssa) (1989), ISBN 92-4-154293-4.
13. M. Czaplicka, *Sci. Total Environ.* 322 (2004) 21.
14. G. Vidal, C. Kennes, R. Méndez, J.M. Lema, *Afinidad* LIV 469 (1997) 207.
15. Final Report to the Department of the Environmental DoE 2285-M/1 Report n° DW I0030, *The production of chlorophenols during the chlorination of natural waters*. Disponible a <http://www.fwr.org/waterq/dwi0030.htm> (consultada el 08/07/04).
16. WHO, *Environmental Health Criteria 71, Pentachlorophenol*, World Health Organization, Ginebra (Suïssa) (1987), ISBN 92-4-154271-3.
17. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4265.
18. P. Patnaik, J.N. Khoury, *Water Res.* 38 (2004) 206.

19. O. Jáuregui, *Metodologia analítica per a la determinació de compostos fenòlics en aigües i sòls* (tesi doctoral). Universitat de Barcelona (1998).
20. <http://www.website.lineone.net/~mwarhurst/apeintro.html> (consultada el 30/06/04).
21. C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, J. Anal. Toxicol. 26 (2002) 129.
22. WHO, *Environmental Health Criteria 192, Flame retardants: a general introduction*, World Health Organization, Ginebra (Suïssa) (1997), ISBN 92-4-157192-6.
23. M.L. Hardy, Chemosphere 46 (2002) 717.
24. K.A. Tuppurainen, P.H. Ruokojärvi, A.H. Asikainen, M. Aatamila, J. Ruuskanen, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 4958.
25. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp50-c5.pdf> (consultada el 08/07/04).
26. T. Hyötyläinen, K. Hartonen, TrAC, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 13.
27. US EPA Office of Water Regulations and Standards, *Ambient Water Quality Criteria for nitrophenols*, 440/5-80-063 Octubre 1980, Washington D.C. 20460 (Estats Units).
28. US EPA Office of Water Regulations and Standards, *Ambient Water Quality Criteria for Chlorinated Phenols*, 440/5-80-032 Octubre 1980, Washington D.C. 20460 (Estats Units).
29. WHO, *Environmental Health Criteria 172, Tetrabromobisphenol A and derivatives*, World Health Organization, Ginebra (Suïssa) (1995), ISBN 92 4 157172 1.
30. C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, J. Sep. Sci. 24 (2001) 282.
31. US EPA Office of Water Regulations and Standards, *Ambient Water Quality Criteria for 2,4-dimethylphenol*, 440/5-80-044 Octubre 1980, Washington D.C. 20460 (Estats Units).
32. US EPA, Toxic Substance Control Act., Washington D.C. (Estats Units), 1979.
33. S. Angelino, M.C. Gennaro, Anal. Chim. Acta 346 (1997) 61.
34. D. Puig, D. Barceló, TrAC, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 362.
35. I. Rodríguez, R. Cela, TrAC, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 463.
36. US EPA method 9065, *Phenolics (spectrophotometric, manual 4-AAP with distillation)*, in Federal Register, Revision 0, Septiembre 1986, Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estats Units).
37. A.E. Greenberg, L.S. Clesceri, A.D. Eaton (eds.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (18^a edició), American Public Health Association, Washington D.C. (Estats Units) (1992), ISBN 0-87553-207-1.
38. K.O. Lupetti, F.R.P. Rocha, O. Fatibello-Filho, Talanta 62 (2004) 463.

-
39. US EPA method 604, *Phenols in Federal Register*, 40CFR, Part 136 (7-1-99 Edition), Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estats Units).
 40. H. Bagheri, M. Saraji, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 111.
 41. F.A. Shammala, *Anal. Lett.* 32 (1999) 3083.
 42. R. Baciocchi, M. Attinà, G. Lombardi, M.R. Boni, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 135.
 43. H. Bagheri, M. Saraji, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 87.
 44. M.C. Wei, J.F. Jen, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 111.
 45. C. Brede, S. Pedersen-Bjergaard, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 45.
 46. L.E. Sojo, J. Djauhari, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 21.
 47. L.A. Reitzel, A. Ledin, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 175.
 48. T.M. Pizzolato, J.L. Foschiera, E. Benvenuti, F. Gomes, A.M. Geller, A. Lopes, M. Do C. Ruaro Peralba, J.H.Z. dos Santos, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1180.
 49. US EPA method 625, *Base/Neutral and Acids in Federal Register*, 40CFR, Part 136, Friday October 26 (1984). Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estats Units).
 50. US EPA method 8270C, *Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)*, Revision 3, Decembre 1996, Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estats Units).
 51. I. Rodríguez, M.C. Mejuto, M.H. Bollaín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 285.
 52. J. Rolfes, J.T. Andersson, *Anal. Commun.* 33 (1996) 429.
 53. I. Rodríguez, M.H. Bollaín, C.M. García, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 405.
 54. US EPA method 8041, *Phenols by Gas Chromatography*, Revision 0, December 1996, Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estats Units).
 55. M. Knutsson, J.A. Jönsson, "Determination of phenolic compounds in water", dins: L.M.L. Nollet (ed.), *Handbook of water analysis*, New York (Estats Units) (2000), ISBN 0-8247-8433-2.
 56. R. Wisiak, E. Rosenberg, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 149.
 57. M. Wada, S. Kinoshita, Y. Itayama, N. Kuroda, K. Nakashima, *J. Chromatogr. B* 721 (1999) 179.
 58. O. Fiehn, M. Jekel, *J. Chromatogr. A* 769 (1997) 189.
 59. C. de Ruiter, J.F. Bohle, G.J. de Jong, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei., *Anal. Chem.* 60 (1988) 666.
 60. F.P. Bigley, R.L. Grob, *J. Chromatogr. A* 350 (1985) 407.

61. W.J. Landzettel, K.J. Hargis, J.B. Caboot, K.L. Adkins, T.G. Strein, H. Veening, H.D. Becker, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 45.
62. N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 547.
63. J.R. Dean, A. Santamaria-Rekondo, E. Ludkin, *Anal. Commun.* 33 (1996) 413.
64. L. Zhao, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 931 (2001) 95.
65. Y. Fan, Y.Q. Feng, S.L. Da, P.Y. Feng, *Anal. Sci.* 19 (2003) 709.
66. N. Fontanals, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 63.
67. N. Fontanals, P. Puig, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 281.
68. M.T. Galcerán, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 75.
69. O. Jáuregui, F.J. Santos, F.J. Pinto, M.T. Galcerán, *Quim. Anal. (Barcelona)* 16 (1997) 247.
70. N. Cardellicchio, S. Cavalli, V. Piangerelli, S. Giandomenico, P. Ragone, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 749.
71. S. Lacorte, D. Fraisse, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 97.
72. M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 155.
73. L. Patrolecco, S. Capri, S. De Angelis, S. Polesello, S. Valsecchi, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 1.
74. Y. Chung, K. Lee, *Microchem. J.* 69 (2001) 143.
75. D. Puig, I. Silgoner, M. Grasserbauer, D. Barceló, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2756.
76. O. Jáuregui, E. Moyano, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 241.
77. R. Wissiack, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 159.
78. D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 113.
79. P. López-Roldán, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 599.
80. D. Puig, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 63.
81. J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* 904 (2000) 171.
82. S. Dupeyron, M. Astruc, M. Marbach, *Analisis* 23 (1995) 470.
83. T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 477.
84. S. Rodríguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 85.

-
85. F. Sánchez-Rabaneda, O. Jáuregui, R.M. Lamuela-Raventós, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 553.
 86. V.R. Meyer, *Practical high-performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (2000), ISBN 0-471-98373-X.
 87. Y. Yang, A.D. Jones, C.D. Eaton, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3808.
 88. Lingyan Zhu, Liang Zhu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 407.
 89. W.E. Rae, C.A. Lucy, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1308.
 90. S. Morales, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 95.
 91. S.P. Porras, R. Kuldvee, S. Palonen, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 990 (2003) 35.
 92. J. Kronholm, P. Revilla-Ruiz, S.P. Porras, K. Hartonen, R. Carabias-Martínez, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 9.
 93. A.L. Crego, M.L. Marina, *J. Liq. Chromatogr. Related. Technol.* 20 (1997) 1.
 94. D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1995), ISBN 0-471-11763-3.
 95. S. Morales, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 401.
 96. A. Zemann, D. Volgger, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3243.
 97. Y.S. Fung, Y.H. Long, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 301.
 98. Z. Demianová, H. Sirén, R.Kuldvee, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 24 (2003) 4264.
 99. S.-P. Wang, K.-J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 273.
 100. US EPA Method 4010, *Screening for pentachlorophenol by immunoassay*, Revision 1, Decembre 1996, Environmental Protection Agency, Washington D.C. (Estats Units).
 101. R.S. Freire, N. Duran, J. Wang, L. Kubota, *Anal. Lett.* 35 (2002) 29.
 102. S. Campuzano, B. Serra, M. Pedrero, F.J. Manuel de Villena, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 187.
 103. M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Anal. Chim. Acta* 428 (2001) 227.
 104. R. Espejo, K. Valter, M. Simona, Y. Janin, P. Arrizabalaga, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 335.
 105. A. Asan, I. Isildak, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 145.
 106. H. Bagheri, A. Saber, S. Reza Mousavi, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 27.
 107. C. Yang, K.C. Teo, Y.R. Xu, *J. Hazard. Mater.* B108 (2004) 77.
 108. G. Arana, G. Borge, N. Etxebarria, L.A. Fernández, *Sep. Sci. and Technol.* 34 (1999) 665.

109. J.-F. Liu, X. Liang, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, Y.-Q. Cai, Q.-X. Zhou, G.-G. Liu, *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 129.
110. P. Barták, L. Cáp, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 171.
111. M. Llopart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 137.
112. A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 79.
113. A. Ribeiro, M.H. Neves, M.F. Almeida, A. Alves, L. Santos, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 267.
114. M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, B.-H. Hwang, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 317.
115. X. Li, Z. Zeng, J. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 509 (2004) 27.
116. S. Nakamura, S. Daishima, *J. Chromatogr. A* (2004), en premsa.
117. A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 173.
118. E.N. Myshak, S.G. Dmitrienko, E.N. Shapovalova, A.V. Zhigulev, O.A. Shpigun, Yu. A. Zolotov, *J. Anal. Chem.* 52 (1997) 1036.
119. K. Rzeszutek, A. Chow, *Talanta* 46 (1998) 507.

1.5 OBJECTIUS

Els compostos fenòlics poden trobar-se al medi ambient procedents d'una gran varietat de processos industrials o derivats del seu ús com a plaguicides, bactericides o conservadors de la fusta. La persistència d'aquests compostos en les diferents matrius ambientals (aire, aigua i sòl) i la seva toxicitat requereixen un control de les seves concentracions en aquestes matrius i també la caracterització dels processos d'interacció, transport i transformació que pateixen en el medi on es troben. Les baixes concentracions màximes establertes per a compostos fenòlics per molts organismes oficials fan necessari el desenvolupament de mètodes de determinació prou sensibles per detectar els nivells establerts per la legislació amb un elevat nivell de confiança.

L'objectiu principal de la present memòria és el desenvolupament de mètodes de determinació de compostos fenòlics, tant en matrius aquoses com en sòls, i la caracterització del processos d'adsorció d'aquests compostos en diferents tipus de sòls. Per tal d'aconseguir aquesta fita, els estudis recollits en aquest treball s'han concretat en l'assoliment dels objectius següents :

1. Desenvolupar un mètode de determinació dels 11 compostos fenòlics considerats com a contaminants prioritaris per la EPA en aigües naturals mitjançant l'aplicació d'una etapa de preconcentració dels anàlits per extracció en fase sòlida (SPE) i detecció per cromatografia líquida amb detector ultraviolat-visible. Per l'etapa d'extracció i preconcentració s'avaluaran fases sòlides amb diferents característiques.
2. Avaluar l'aplicabilitat d'un mètode basat en la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses per a la determinació de compostos fenòlics bromosubstituïts i compostos bisfenòlics en aigües residuals. Comparació de l'eficàcia de diferents reactius per a la derivatització dels anàlits prèvia a la seva detecció.
3. Optimitzar un mètode d'anàlisi dels compostos fenòlics exposats en el punt 1 en sòls per mitjà de la combinació d'una extracció alcalina, preconcentració i purificació

dels extractes per extracció en fase sòlida, i detecció dels anàlits per cromatografia líquida acoblada a un detector ultraviolat-visible.

4. Comparació de mètodes de fortificació de sòls amb compostos fenòlics i avaluació de les transformacions que es produeixen durant aquest procés emprant dues metodologies diferents (*spot spiking* i *slurry spiking*)
5. Caracterització dels processos d'adsorció de quatre compostos fenòlics (fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol i 2,4-diclorofenol) en sòls amb diferents propietats físico-químiques per tal de predir el destí o comportament d'aquestes substàncies un cop abocades al medi natural.

CAPÍTOL 2

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ D'ONZE COMPOSTOS FENÒLICS CONSIDERATS CONTAMINANTS PRIORITARIS PER LA EPA EN AIGÜES NATURALS

| | |
|---|-----------|
| 2.1 INTRODUCCIÓ | 61 |
| 2.1.1 L'extracció en fase sòlida (SPE)..... | 62 |
| 2.1.1.1 Extracció en fase sòlida de fase reversa | 63 |
| 2.1.2 Anàlisi de fenols per SPE de fase reversa | 64 |
| 2.1.2.1 Primers sorbents | 64 |
| 2.1.2.2 Noves fases sòlides..... | 67 |
| 2.1.3 Altres mecanismes per a la SPE de fenols..... | 69 |
| 2.1.4 Formats per a SPE | 70 |
| 2.1.5 Avantatges de la SPE..... | 71 |
| 2.1.6 Compostos fenòlics estudiats..... | 71 |
| 2.2 EXPERIMENTAL | 73 |
| 2.2.1 Reactius..... | 73 |
| 2.2.2 Aparells i material..... | 74 |
| 2.2.3 Procediment Experimental..... | 75 |
| 2.2.3.1 Anàlisi de compostos fenòlics | 75 |
| 2.2.3.2 Preconcentració per extracció en fase sòlida..... | 75 |
| 2.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ | 77 |
| 2.3.1 Caracterització del mètode cromatogràfic | 77 |
| 2.3.2 Estudis de preconcentració de fenols amb el cartutx Spe-ed Advanta® | 81 |
| 2.3.2.1 Caracterització de la matriu sòlida | 81 |
| 2.3.2.2 Avaluació de les condicions d'extracció | 82 |
| 2.3.2.2.1 Estudi del cabal de càrrega..... | 82 |
| 2.3.2.2.2 Influència del pH de la mostra | 84 |
| 2.3.2.2.3 Estudi de les condicions d'elució..... | 85 |
| 2.3.2.2.4 Efecte del volum i la concentració de la mostra | 86 |
| 2.3.2.3 Aplicació del mètode a aigües naturals | 87 |
| 2.3.3 Avaluació d'altres sorbents per a la preconcentració de fenols..... | 88 |
| 2.4 REFERÈNCIES | 91 |

2.1 INTRODUCCIÓ

L'anàlisi d'aigües, ja siguin superficials, subterrànies o procedents d'estacions depuradores d'aigües residuals, és una pràctica de vital importància, especialment quan van destinades al consum humà. La presència de substàncies tòxiques en el medi hídric, ja siguin de caràcter orgànic o inorgànic, produeix efectes nocius sobre les espècies que hi viuen i sobre la salut humana. A més, alguns compostos orgànics, com és el cas dels compostos

fenòlics, repercuteixen negativament en les propietats organolèptiques de l'aigua (olor i gust principalment) tot i trobar-se a nivells de concentració molt per sota dels que es consideren perillosos per a la salut. Per totes aquestes raons, l'anàlisi de derivats fenòlics en aigües ha esdevingut una rutina en molts laboratoris, fet que ha provocat que la quantitat de mètodes desenvolupats a tal fi sigui bastant nombrós. Tot i que les metodologies aplicades a l'anàlisi de fenols en aigües són diverses, la tendència actual en l'extracció, purificació i preconcentració de fenols (com en el cas de molts altres contaminants orgànics) és l'**extracció en fase sòlida** (SPE).

2.1.1 L'extracció en fase sòlida (SPE)

L'extracció en fase sòlida és un sistema de preparació de mostres que permet la concentració i purificació dels anàlits presents en una solució mitjançant la seva adsorció en una fase sòlida i posterior elució amb un solvent apropiat per a l'anàlisi instrumental. En general, el volum necessari per aconseguir l'elució dels anàlits és molt inferior al volum de mostra aplicat i d'aquesta manera s'aconsegueixen factors de concentració elevats.

Els inicis de la SPE es remunten a finals de la dècada dels 70, data en que van aparèixer les primeres fases en format cartutx i xeringa d'un sol ús. Durant els anys immediatament posteriors a la seva implantació, el desenvolupament de la SPE va ser lent perquè els analistes es resistien a abandonar l'extracció líquid-líquid, però a mitjans dels anys 80 i com a conseqüència de l'aparició de nous formats en SPE, l'automatització de la tècnica i la comercialització de nous tipus de fases, l'extracció en fase sòlida va arribar a ser el que és avui en dia, la tècnica de purificació i concentració preferida pels científics [1]. L'extracció en fase sòlida consisteix bàsicament en 4 etapes: **condicionament** de la fase, **adsorció** (pas de la mostra), **rentat** de la fase i **elució** dels anàlits retinguts a la fase sòlida.

En el condicionament, el pas d'un solvent orgànic (normalment metanol) solvata els grups funcionals de la fase sòlida i elimina l'aire dels porus. El condicionament amb metanol és seguit del pas d'una solució de medi igual que la mostra per tal que els mecanismes d'adsorció només depenguin de les característiques dels anàlits en la següent etapa. El volum de mostra tractat en l'etapa d'adsorció es tria en funció dels requeriments de cada tipus d'anàlisi (concentració d'anàlits a la mostra i sensibilitat del sistema de detecció) encara que el volum que es pot processar depèn, en gran mesura, de la massa de fase sòlida, del flux de pas i del volum de trencament del sorbent per a cada tipus de compost. El rentat de la fase

sòlida és la tercera etapa del procés i serveix per eliminar les restes de matriu de la mostra dels porus del sorbent. L'elució es realitza amb el mínim volum necessari d'un solvent compatible amb el sistema de detecció i, a la vegada, que sigui capaç de trencar les interaccions anàlit-sorbent obtenint-se una recuperació quantitativa. Les interaccions que es produeixen entre els anàlits i la fase sòlida condicionen els tres mecanismes bàsics en SPE: fase reversa, fase normal i bescanvi iònic [2].

- La **fase reversa** implica la distribució dels soluts orgànics entre una fase mòbil polar i una fase sòlida apolar.
- La **fase normal** implica l'adsorció dels anàlits dissolts en una fase orgànica en un sorbent de caràcter polar.
- El **bescanvi iònic** consisteix en la interacció entre els soluts orgànics carregats dissolts en un solvent polar o no polar i el sorbent de bescanvi iònic, que conté grups funcionals que actuen com intercanviadors d'ions i que presenta una càrrega oposada a la de l'anàlit.

Cadascun d'aquests mecanismes està governat per un tipus d'interacció anàlit-sorbent que fa possible el procés SPE. Existeixen sorbents que, per la seva naturalesa, combinen més d'un d'aquests mecanismes (SPE en mode mixt). Més recentment, s'han desenvolupat nous modes de SPE com la SPE d'afinitat, la SPE d'impressió molecular (*molecular recognition and molecular-imprinting SPE*) o la SPE que utilitza sorbents discriminants segons la mida de partícula a retenir (*restricted acces sorbents*) amb la finalitat de desenvolupar processos cada cop més selectius. El mecanisme més habitual en la determinació de compostos orgànics en aigües és la fase reversa el qual es comenta més detalladament en el següent apartat.

2.1.1.1 Extracció en fase sòlida de fase reversa

L'extracció en fase sòlida de fase reversa suposa la partició dels compostos orgànics objecte d'estudi entre una fase líquida polar tal com aigua i un sorbent no polar. Les interaccions que tenen lloc en aquest procés són de tipus apolar (forces de Van der Waals, forces de dispersió o partició), són interaccions de baixa energia (aproximadament 5 Kcal·mol⁻¹) comparables a les implicades en un procés d'extracció líquid-líquid [2].

Els sorbents de fase reversa que es van desenvolupar primer tenen una base de sílice, modificada amb grups funcionals de diferent naturalesa, essent les cadenes hidrofòbiques C₁₈

(18 àtoms de carboni) les més habituals. Altres funcionalitzacions inclouen grups etil (C₂), octil (C₈), ciclohexil i fenil. El segon i tercer tipus de sorbents per a fase reversa són, respectivament, els de matriu polimèrica (generalment poliestirè-divinilbenzè) i els de base de carbó grafititzat.

2.1.2 Anàlisi de fenols per SPE de fase reversa

Tots els sorbents descrits a l'apartat anterior s'han aplicat per a l'extracció i concentració de compostos fenòlics presents en mostres aquoses. No obstant, s'ha de tenir en compte que, degut a les grans diferències en quant a acidesa i polaritat dels diferents tipus de derivats fenòlics, no és senzill desenvolupar mètodes d'extracció en fase sòlida aplicables satisfactòriament a tota la sèrie de compostos. Això ha provocat que sigui nombrosa la quantitat de mètodes que descriuen l'extracció de fenols per SPE i que empren sorbents molt variats, sempre amb l'objectiu d'intentar millorar l'eficàcia dels ja existents.

2.1.2.1 Primers sorbents

Els sorbents amb base de sílice són els primers que es van desenvolupar per concentrar compostos orgànics de mostres aquoses atesa la seva analogia amb les fases sòlides usades en cromatografia líquida. La incorporació de cadenes hidrofòbiques en el si de l'estructura de la sílice permet utilitzar aquest material com a fase sòlida per a l'anàlisi de mostres aquoses. Els materials que resulten d'aquest tipus de modificacions són fases de caràcter hidrofòbic que no sempre són les més adients per a la retenció dels derivats fenòlics més polars. No obstant això, són nombrosos els mètodes SPE desenvolupats per a fenols que utilitzen sorbents amb matriu de sílice dels quals els més habituals són els que presenten cadenes C₁₈ [3-6]. Els resultats obtinguts amb aquestes fases no són, en general, gaire satisfactoris degut a la poca capacitat de retenció (o d'adsorció) que presenten per als compostos fenòlics més polars. A més, degut al comportament acídic d'alguns derivats com el pentaclorofenol i els dinitrofenols, és necessari sempre ajustar les mostres a pH 1-2 prèviament al procés SPE. Els enllaços entre la base de sílice i el residu apolar poden ser monofuncionals, si presenten un sol enllaç Si-O-Si, o trifuncionals si contenen dues d'aquestes estructures. En tots dos casos, les fases contenen grups silanol lliures (Si-OH) a la seva superfície que, generalment, es derivatitzen per convertir-los en grups Si-(CH₃) no tant polars (*endcapping*). Malgrat això, la presència d'alguns grups Si-OH permet la formació d'enllaços per pont d'hidrogen entre el

sorbent i els fenols, interaccions secundàries que fan possible la concentració de volums més grans d'aquests compostos [7]. El que cal tenir en compte, però, és el risc de que es produeixin adsorcions irreversibles que dificultin el procés d'elució.

S'han portat a terme altres tipus de funcionalitzacions sobre la matriu de sílice per tal de millorar les recuperacions obtingudes per a fenols. A tal fi, Pizzolato et al. [8] modifiquen sílice gel amb grups anilina, 3-fenilcloropropilamina i benzilamina i comparen els resultats obtinguts amb els que proporcionen fases C₁₈ convencionals. Una altra modificació és la proposada per Fan et al. en dos dels seus treballs [9,10] en els quals enllacen una funció β -ciclodextrina a la base de sílice. Aquest sorbent resulta ser eficaç en l'extracció de fenols nitro-substituïts en la seva posició *para* però, en aquest cas, les interaccions que es donen entre els anàlits i la fase sòlida es produeixen de forma selectiva mitjançant la formació de complexos d'inclusió, mecanisme similar al que es dona amb els polímers d'impressió molecular (dels quals es parlarà més endavant). Per altra banda, en un treball realitzat per Abu-Shammala [11] s'aconsegueix millorar els resultats obtinguts amb C₁₈ per a compostos fenòlics carregant prèviament de tensioactius catiònics la fase; aquests actuen com a bescanviadors iònics. D'aquesta manera, l'adsorció combina dos tipus de mecanismes: per una banda les interaccions hidrofòbiques habituals amb la cadena carbonada i, per l'altra, les interaccions electrostàtiques involucrades en un procés d'intercanvi iònic.

El segon tipus de sorbents utilitzats en l'extracció en fase sòlida de compostos fenòlics són els que presenten una matriu polimèrica, essent els més habituals els de poliestirè entrecreuat amb divinilbenzè (PS-DVB). La retenció de fenols en aquest tipus de matrius es veu incrementada respecte a la que s'observa en les fases de sílice-C₁₈ degut a les interaccions de tipus π - π entre els anells aromàtics del sorbent i dels anàlits. Són sorbents més estables que els C₁₈ a valors de pH extrems i en general resulten ser més eficaços per a compostos polars. Aquesta major aplicabilitat es pot atribuir al seu major contingut en carboni (gairebé un 90% respecte el 18% màxim de les fases C₁₈) però sobretot a la seva major àrea superficial. Les característiques físiques dels polímers, no obstant, varien en funció de la casa comercial que els fabrica degut a diferències en el procés de polimerització i en el contingut en divinilbenzè. Així, a la **Taula 2.1** es recullen alguns dels sorbents comercials de PS-DVB més aplicats a l'extracció en fase sòlida de fenols, juntament amb les seves propietats físiques.

| Polímer | casa comercial | mida partícula (μm) | mida porus (Å) | àrea superficial ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) | referències |
|--------------------|----------------------|----------------------------------|---------------------------|---|-------------|
| PLRP-S | Spark Holland | 15-25 | 100 | 500 | [12,13] |
| PLRP-10 | Polymer Laboratories | 10-15 | 100 | 500 | [14] |
| PLRP-30 | Polymer Laboratories | 10-15 | 300 | 375 | [14] |
| PRP-1 | Hamilton | 5 | 100 | 415 | [15] |
| LiChrolut EN | Merck | 40-120 | 80 | 1200 | [16] |
| Isolute ENV+ | IST | 40-140 | 100 | 1000-1100 | [17,18] |
| Amberchrom GC-161m | Tosohaas | 50-100 | 150 | 900 | [19] |
| Hysphere-1 | Spark Holland | 5 | n.v. | >1000 | [20] |
| SDB-1 | J.T. Baker | 43-123 | 300 | 916 | [15] |
| Envi-chrom P | Supelco | 80-160 | 140 | 900 | [21] |
| XAD-2 | Rohm and Haas | 100-150 | 90 | 300 | [22] |
| XAD-4 | Rohm and Haas | 100-150 | 50 | 750 | [23] |

IST: International Sorbent Technology

n.v.: valor no disponible

Taula 2.1 Sorbents de PS-DVB per a SPE de compostos fenòlics

L'àrea superficial d'aquest tipus de polímer té un efecte molt important en l'eficàcia de retenció per als compostos fenòlics més polars. Així, en general, sorbents amb major àrea superficial (o menor mida de partícula) proporcionen volums de trencament més grans, essent els de superfície $>1000 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ els més efectius.

El tercer tipus de fases estacionàries utilitzades en la fase reversa de fenols són les de carbó grafititzat [18,24,25]. La retenció de fenols en aquests materials es deu a la combinació de diferents mecanismes: les interaccions hidrofòbiques característiques de la fase reversa, la possibilitat d'interaccions de tipus π - π entre el sorbent i els anells aromàtics dels anàlits i, a més, els grups carboni-oxigen que actuen com a bescanviadors aniònics en presència de matrius aquoses acidificades. Per tots aquests mecanismes, els polímers de carbó són capaços de retenir anàlits extremadament polars [2] fet que dificulta molt la seva elució i sovint és necessari dur-la a terme aplicant fluxos en sentit contrari al pas de la mostra [26]. Un altre inconvenient que presenten és que són materials no porosos i, si el volum de mostra a percolar és gran, poden oferir gran resistència al seu pas. Gawkzik et al [27] varen sintetitzar sorbents

amb un elevat percentatge de carbó a partir de copolímers de 4,4'-*bis*(maleimidodifenil)metà i divinilbenzè, alguns dels quals mostren una adsorció acceptable per a certs derivats fenòlics.

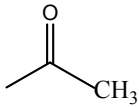
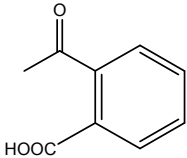
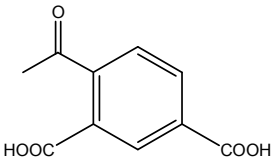
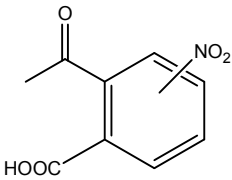
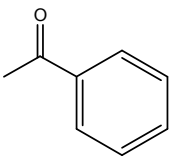
Totes les fases sòlides comentades fins al moment han estat àmpliament estudiades per a l'extracció i concentració de compostos fenòlics de mostres aquoses. Tot i que moltes d'elles proporcionen bons resultats per als compostos més hidrofòbics, el problema de la majoria continua essent la seva eficàcia en la retenció i elució dels derivats més polars.

2.1.2.2 Noves fases sòlides

Per augmentar l'eficàcia del procés SPE per a compostos hidrofílics s'han utilitzat sorbents amb àrea superficial elevada que proporcionen més punts de contacte amb els anàlits, tal com hem vist a l'apartat anterior. No obstant això, la tendència actual és desenvolupar noves metodologies que utilitzen sorbents cada vegada més adaptats a les necessitats d'aquest tipus de compostos. Bàsicament, per millorar els resultats obtinguts en la SPE de compostos polars com els fenols, es pot [28]:

1. utilitzar sorbents polimèrics funcionalitzats amb grups polars.
2. preparar nous tipus de polímers a partir d'un monòmer hidrofílic i un agent entrecruador
3. utilitzar fases sòlides que proporcionin interaccions selectives amb els anàlits.
4. derivatitzar els compostos fenòlics prèviament al procés SPE per incrementar la seva hidrofobicitat.

La retenció de fenols polars en les matrius de PS-DVB es veu millorada amb la introducció de grups també polars a l'esquelet del polímer. Els materials que resulten d'aquestes modificacions encara conserven la capacitat d'adsorbir els compostos més hidrofòbics però, a més, la presència d'aquests grups millora el contacte amb les solucions aquoses i, en conseqüència, la transferència de massa del líquid a la fase sòlida [29]. Addicionalment, la presència d'unitats polars provoca que es donin interaccions secundàries entre elles i els anàlits més hidrofílics i així s'aconsegueix millorar la seva extracció. Els grups funcionals més habituals emprats per a aquest tipus de modificacions es recullen a la **Taula 2.2**. Comparar totes aquestes fases és molt complicat ja que la majoria no són comercials i la descripció detallada de la seva síntesi i les propietats físiques sovint no s'especifica a la bibliografia.

| Grup funcional | Estructura | Referències |
|----------------------------|---|-------------|
| acetil |  | [30] |
| <i>o</i> -carboxibenzoil |  | [14,26] |
| 2,4-dicarboxibenzoil |  | [19] |
| 2-carboxi-3/4-nitrobenzoil |  | [19] |
| hidroximetil | $\text{—CH}_2\text{OH}$ | [31] |
| benzoil |  | [32] |
| àcid carboxílic | COOH | [33] |
| àcid sulfònic | SO ₃ H | [34] |

Taula 2.2 Funcionalitzacions més habituals per als sorbents PS-DVB

A banda, existeixen certs sorbents comercials basats també en una matriu de PS-DVB funcionalitzada com Hysphere SH de Spark Holland [12,35] i Bond Elut PPL de Varian [20,26] que s'han aplicat a l'anàlisi de compostos fenòlics. En aquests casos, les cases comercials no detallen quin tipus de modificació s'ha aplicat sobre la matriu de poliestirè.

La segona opció per millorar l'eficàcia de l'extracció en fase sòlida dels compostos fenòlics més polars és la preparació de nous tipus de polímers a partir d'un monòmer hidrofílic i un agent entrecreudador. D'aquests, potser el més conegut és el sorbent Oasis HLB

de Waters, basat en una matriu de divinilbenzè i N-vinilpirrolidona, àmpliament utilitzat per a l'extracció en fase sòlida de fenols [6,36-38]. L'avantatge d'aquest material respecte als polímers de poliestirè comentats anteriorment és que, al ser més flexible, l'assecat de la fase sòlida durant el procés d'extracció no disminueix la seva capacitat de retenció. Altres tipus de polímers desenvolupats més recentment per augmentar l'eficàcia del procés SPE per a compostos polars són els basats en divinilbenzè i 4-vinilpiridina [39,40], divinilbenzè i vinilimidazola [41,42,43], anilina [44,45], pirrol [46,47] o divinilbenzè i clorometilestirè [48,49]. En tots ells es combina l'efecte del caràcter hidrofílic del monòmer utilitzat amb una elevada àrea superficial per tal d'aconseguir un millor contacte del sorbent amb les mostres aquoses i una millor extracció dels compostos polars.

2.1.3 Altres mecanismes per a la SPE de fenols

Tot i que els mecanismes de fase reversa han estat els més àmpliament estudiats per a l'extracció de compostos fenòlics presents en mostres aquoses, no són els únics que s'han aplicat. La preconcentració de fenols mitjançant una resina d'intercanvi aniònic [23] és possible si considerem les propietats àcid-base que presenten aquests compostos que fan que es trobin en forma neutra o desprotonada en funció del valor de pH al que s'ajusti la mostra.

La tècnica de cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC) també s'ha aplicat a l'extracció de fenols. En aquest procés, té lloc la immobilització d'un ió metàl·lic apropiat en un suport polimèric mitjançant un grup actiu quelant que permet la interacció selectiva entre les espècies d'interès i aquest metall immobilitzat. Concretament Hrubý et al. [50] estudien l'adsorció de fenols en un sorbent basat en grups 8-hidroxiquinoleïna enllaçats covalentment a una matriu de metacrilat a través d'un espaiador i carregats amb Ag(I), Cu(II) i Fe(III).

El major problema de moltes metodologies SPE és la manca de selectivitat de les fases sòlides utilitzades. Aquest fet implica una dificultat addicional quan, a més dels anàlits d'interès, la mostra conté altres substàncies estructuralment similars. En el cas dels compostos fenòlics en l'anàlisi d'aigües, els àcids húmics i fúlvics presents a les aigües naturals són coextrets juntament amb els fenols amb la majoria de sorbents i la seva presència als extractes provoca, quan aquests són analitzats per cromatografia líquida, una banda ampla a l'inici dels cromatogrames que dificulta la quantificació d'alguns d'aquests anàlits. Per solucionar aquests inconvenients, cada cop són més els treballs que intenten sintetitzar sorbents més selectius, com és el cas dels polímers d'impressió molecular (MIPs). En l'extracció en fase

sòlida d'impressió molecular s'utilitza una molècula plantilla per sintetitzar polímers altament entrecruats de manera que, posteriorment a la retirada de la plantilla, el polímer conté uns "forats" que es corresponen a l'empremta de la molècula i per tant són capaços d'enllaçar-la selectivament. El procés s'esquematitza a la **Figura 2.1**.

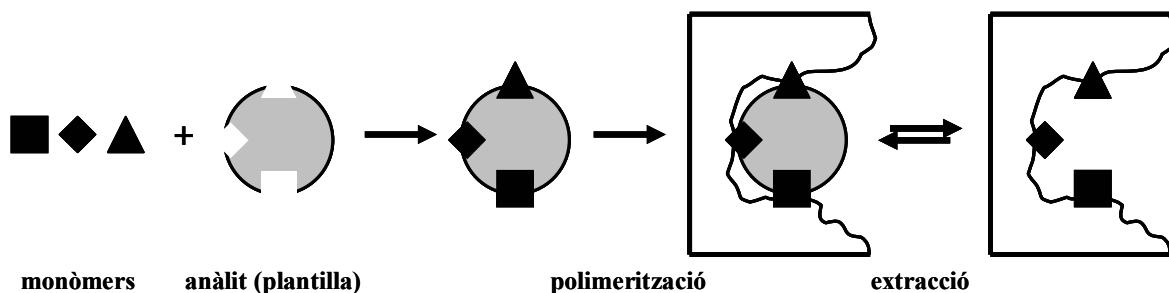


Figura 2.1 Procés de formació d'un polímer d'impressió molecular (els monòmers són molècules capaces d'interaccionar amb punts actius de l'anàlit o molècula plantilla).

L'inconvenient d'aquestes fases apareix quan a partir d'un mateix polímer d'impressió molecular es vol extreure tota una família de compostos. Per exemple, Caro et al. [51] preparen tres MIPs amb 4-clorofenol com a molècula plantilla els quals resulten ser efectius per aquest compost i per altres fenols substituïts en la posició 4 de l'anell aromàtic. Baggiani et al. [52] sintetitzen un polímer imprès selectiu per a pentaclorofenol i estudien la seva selectivitat envers altres 52 fenols mitjançant anàlisi de components principals i obtenen que aquest polímer presenta també certa selectivitat per a fenols clorats per efectes d'hidrofobicitat, efectes estèrics i electrònics i també per a derivats voluminosos com, per exemple, 2,3,5,6-tetrametilfenol, 2-fenilfenol o 4-fenilfenol. Navarro-Villoslada et al. [53], per la seva banda, preparen MIPs per a bisfenol A amb diferents monòmers (tipus i quantitat), mètodes de polimerització, solvents i quantitats de molècula plantilla.

2.1.4 Formats per a SPE

Els sorbents utilitzats per a SPE poden estar empaquetats en tres formats bàsics: discs, cartutxos i dipòsits en format xeringa. Pel que fa a les dimensions, els discs estàndard són els que tenen un diàmetre de 47 mm i pel que fa a la quantitat de fase present en cartutxos i

xeringues, aquesta oscil·la entre 100 mg i 1 g per als cartutxos i entre 50 mg i 10 g per al format xeringa amb dipòsits de mostra d'1 a 25 mL. En general, els discs són l'opció preferida quan es tenen grans volums de mostra. La seva superfície pot arribar a ser fins a 20 vegades superior a la d'un cartutx i això permet que es puguin aplicar fluxos més alts de pas de mostra sense observar pèrdues en eficàcia de retenció. Un inconvenient associat a les membranes o discs és que, en general, es necessiten volums més grans d'eluent, per tant, si es volen aconseguir factors de concentració elevats, cal una evaporació prèvia dels extractes abans de la seva anàlisi, que introdueix una nova etapa en el procés analític i que pot conduir a pèrdues dels anàlits més volàtils. En els sistemes SPE aplicats *on-line* als sistemes de detecció cromatogràfica la quantitat de sorbent utilitzat és molt menor que en els mètodes *off-line* per tal que es pugui dur a terme l'elució dels anàlits amb la mínima quantitat possible de dissolvent. En aquests casos, doncs, és precís escollir sorbents amb alts factors de retenció per als compostos d'interès.

2.1.5 Avantatges de la SPE

La tècnica d'extracció en fase sòlida presenta avantatges únics i característiques atractives [54]:

- Simplicitat i rapidesa.
- Possibilitat de realitzar *clean-up*, preconcentració i canvi de solvent en un sol pas.
- Ús reduït de solvents orgànics.
- Recuperacions i factors de preconcentració elevats.
- Facilitat d'automatització i acoblament en línia amb les tècniques cromatogràfiques.
- Gran aplicabilitat de la tècnica degut a l'extens nombre de fases disponibles.

Per totes aquestes raons, la SPE és un dels millors mètodes de tractament de les mostres i el futur de la tècnica va encaminat al desenvolupament de fases sòlides cada cop més selectives i que permetin una major eficàcia en el procés d'extracció i preconcentració.

2.1.6 Compostos fenòlics estudiats

En aquest capítol es desenvolupa un mètode SPE per a l'extracció i preconcentració dels 11 compostos fenòlics considerats com a contaminants prioritaris en les aigües per la EPA

(mètode 604). Algunes de les propietats fisicoquímiques més importants d'aquests compostos es resumeixen a la **Taula 2.3**.

| compost | nom abreviat | pes molecular (g/mol) | T _{ebull.} (°C) (a 760Torr) | log K _{ow} | pKa | P _{vapor} (Torr) (a 25°C) |
|--------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------|-------|------------------------------------|
| fenol | Ph | 94.11 | 181.8 | 1.482 | 9.86 | 0.614 |
| 2-clorofenol | 2CP | 128.56 | 175.0 | 2.038 | 8.50 | 0.875 |
| 2-nitrofenol | 2NP | 139.11 | 215.8 | 1.709 | 7.14 | 0.099 |
| 2,4-diclorofenol | 24DCP | 163.00 | 210.0 | 2.995 | 8.05 | 0.136 |
| 4-cloro-3-metilfenol | 4C3MP | 142.58 | 235.0 | 2.886 | 9.63 | 0.034 |
| 2,4-dimetilfenol | 24DMP | 122.16 | 210.9 | 2.402 | 10.61 | 0.129 |
| 2,4-dinitrofenol | 24DNP | 184.11 | 312.1 | 1.735 | 4.04 | 2.94·10 ⁻⁴ |
| 2-metil-4,6-dinitrofenol | 2M46DNP | 198.13 | 332.4 | 2.195 | 4.42 | 7.57·10 ⁻⁵ |
| 4-nitrofenol | 4NP | 139.11 | 300.6 | 1.570 | 7.23 | 6.23·10 ⁻⁴ |
| pentaclorofenol | PCP | 266.34 | 309.5 | 4.777 | 4.68 | 3.49·10 ⁻⁴ |
| 2,4,6-triclorofenol | 246TCP | 197.45 | 246.0 | 3.576 | 6.59 | 0.018 |

Taula 2.3 Propietats fisicoquímiques dels 11 compostos fenòlics estudiats.

2.2 EXPERIMENTAL

2.2.1 Reactius

- 4-cloro-3-metilfenol: sòlid, 99.5%, ref. C11440300, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2-clorofenol: líquid, 99.5%, ref. C11470000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-diclorofenol: sòlid, 99.5%, ref. C12451000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-dinitrofenol: sòlid, 83.5%, ref. C12785000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-dimetilfenol: líquid, 98%, ref. C12731000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2-nitrofenol: sòlid, 98.5%, ref. C155902, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 4-nitrofenol: sòlid, 99%, ref. C15590400, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- Fenol: sòlid, 99.5%, ref. C16025000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4,6-triclorofenol: sòlid, 97%, ref. 91340, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Pentaclorofenol: sòlid, 98%, ref. P260-4, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- 2-metil-4,6-dinitrofenol: sòlid, 90%, ref. C13050000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- Àcid clorhídric (HCl): líquid, p.a. 37%, ref. 30721, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich GmbH (Gilligham-Dorset, Regne Unit).
- Àcid acètic (CH₃COOH): líquid, 99.7% ACS reagent, ref. 32009-9, Aldrich (Gilligham-Dorset, Regne Unit).
- Acetonitril (CH₃CN): líquid, RS-PLUS per HPLC >99.9%, ref. 412392, Carlo Erba (Rodano, Itàlia)
- Metanol (CH₃OH): líquid, RS-PLUS per HPLC 99.9%, ref. 412383, Carlo Erba (Rodano, Itàlia)

Es preparen dissolucions estoc de concentració aproximada 1000 mg·L⁻¹ de cadascun dels compostos fenòlics individuals en metanol i acetonitril. A partir d'aquests estocs es

preparen dues solucions intermèdies de concentració 50 o 10 mg·L⁻¹, una d'elles conté tots els anàlits excepte 2-metil-4,6-dinitrofenol i l'altra només conté aquesta última substància. Els patrons de calibratge i les solucions de fortificació de les aigües, de concentració adient per a cada cas, es preparen per dilució de les solucions intermèdies amb metanol, acetonitril o aigua bidestil·lada. Totes les solucions, una vegada preparades, es conserven a la nevera (4-5°C).

2.2.2 Aparells i material

- Cromatògraf líquid Spectra System de Thermofinnigan (USA) equipat amb una vàlvula d'injecció Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, Estats Units) amb *loop* de 20 µL, bomba P2000, sistema de desgasificació SCM1000, controlador SN4000 i detector de díodes en línia UV6000. Per dur a terme la separació dels anàlits s'utilitza una columna cromatogràfica Kromasil 100 C₁₈ de 5µm de mida de partícula i 20×0.46cm (ref. TR-011942) acoblada a una precolumna de tipus ODS (ref. TR-C-160-1), ambdues de Teknokroma (Barcelona, Espanya).
- Bomba peristàltica Minipuls3 model M312, Gilson (Villiers, França).
- pHmetre GLP22, Crison (Barcelona, Espanya).
- Ultrasons P Selecta (Abrera, Espanya) per desgasificar la fase mòbil.
- Balança analítica electrònica A200S amb precisió de ± 0.1 mg, Sartorius Analytic (Göttingen, Alemanya).
- Conductímetre 524 complet (cèl·lula 52-90) ref. 01-524-01, Crison Instruments S.A. (Barcelona, Espanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de 47 mm i 0.45 µm de mida de porus ref. 7404-004, Whatman (Maidstone, Regne Unit).
- Xeringues per a HPLC de 100 i 500 µL, Hamilton (Bonaduz, Suïssa).
- Adaptador per a cartutx PTFE Isolute (1, 3, 6 mL) ref. 120-1100, International Sorbent Technology LTD (Hengoed, Regne Unit).
- Filtre de membrana d'acetat de cel·lulosa de 47 mm i 0.45 µm de mida de porus ref. 7184-004, Whatman (Maidstone, Regne Unit).
- cartutx Spe-ed Advanta de 100mg i 3mL de capacitat, ref. 4264, Applied Separations (Allentown, Estats Units).
- cartutx Isolute ENV+ de 100mg i 10mL de capacitat, ref. 915-0010-G, International Sorbent Technology (Hengoed, Regne Unit).

- cartutx AccuBOND II ODS-C18 500mg/3mL ref. 188-1350, Agilent Technologies (South Queensferry, West Lothian, Regne Unit).

2.2.3 Procediment Experimental

2.2.3.1 Anàlisi de compostos fenòlics

Els compostos fenòlics estudiats s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detecció UV-Vis. En un primer moment es va decidir treballar amb quatre fenols representatius de tota la gamma (fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol i 2,4-diclorofenol) i es va optimitzar tant el mètode de detecció com de preconcentració per aquests quatre compostos. Més endavant, però, es va creure necessari ampliar l'estudi als 11 compostos fenòlics considerats com a contaminants prioritaris per la EPA i es va desenvolupar un segon mètode aplicable a tot el grup de compostos (els resultats corresponents són els que es presenten en aquest capítol).

En el mètode desenvolupat es parteix d'una barreja d'acetonitril i aigua per tal d'aconseguir unes condicions de gradient que permetin separar els 11 compostos estudiats en el temps mínim. Les condicions òptimes trobades són les següents: es comença amb una mescla acetonitril:H₂O 30:70 que es manté durant 12 minuts, llavors s'incrementa la quantitat d'acetonitril fins a una relació 78:22 en 12 minuts i es manté aquesta proporció durant 11 minuts. El temps total necessari per separar tots els compostos és de 35 minuts. Tant l'acetonitril com l'aigua contenen un 1% d'àcid acètic per assegurar que els anàlits es trobin en forma neutra durant la separació cromatogràfica. La detecció es realitza amb un detector de díodes en línia a 275 nm per a tots els compostos excepte 2-metil-4,6-dinitrofenol que es detecta a 316 nm. El volum de mostra que s'injecta en cada cas és de 20 µL.

2.2.3.2 Preconcentració per extracció en fase sòlida

El sorbent utilitzat per retenir els compostos fenòlics presents en les mostres aquoses és una fase polimèrica amb un alt grau d'entrecruament i funcionalitzada amb grups de caràcter polar. El procediment experimental inclou fonamentalment quatre etapes que són les que ja s'han comentat a l'apartat 2.1.1. El condicionament de la fase sòlida es realitza amb 2 mL de metanol, que solvata els grups funcionals i elimina l'aire present en els espais buits, i 2 mL

d'aigua bidestil·lada ajustada al pH en què es passarà la mostra. Abans del condicionament, en els casos en que el solvent d'elució no és metanol, es passen 2 mL de l'eluent corresponent (en tots els casos, acetonitril) per eliminar impureses presents en el material i que posteriorment podrien ser eluïdes juntament amb els anàlits. La càrrega de la mostra amb els anàlits té lloc a diferents pHs i fluxos (són dos dels paràmetres que s'avaluen) amb ajuda d'una bomba peristàltica o un sistema de buit en funció de la velocitat requerida. Un cop s'ha passat la mostra, es renta la fase amb 2 mL d'aigua bidestil·lada igual que la utilitzada en el condicionament i es deixa passar aire per la fase durant 5 minuts per eliminar les restes de solució dels intersticis. Els anàlits adsorbits a la fase sòlida s'elueixen amb diferents porcions de metanol o acetonitril per gravetat, les quals s'analitzen amb el mètode de cromatografia líquida descrit.

2.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest capítol es desenvolupa una metodologia per a la determinació dels compostos fenòlics considerats com a contaminants prioritaris per la EPA presents en mostres aquoses mitjançant extracció en fase sòlida amb un sorbent polimèric i detecció per cromatografia de líquids amb un detector de díodes en línia.

2.3.1 Caracterització del mètode cromatogràfic

Per tal d'optimitzar la fase mòbil més adient per dur a terme la separació dels 11 compostos d'interès s'ha partit d'una mescla acetonitril-aigua que contenia un 1% d'àcid acètic. En un principi, treballant amb una mostra que presentava tots els anàlits, es proven diferents composicions de la fase mòbil, sempre en mode isocràtic, fins a trobar aquella que separi amb una millor resolució els primers compostos. Mantenint les condicions isocràtiques, la durada del procés de separació és molt gran, per la qual cosa s'opta per aplicar un gradient de fase mòbil que permeti separar els 11 fenols estudiats amb la màxima resolució i el mínim temps possible. Les condicions més adients per tal de dur a terme la separació són les que es mostren a la **Taula 2.4**.

| temps (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0 | 30 | 70 |
| 12 | 30 | 70 |
| 24 | 78 | 22 |
| 35 | 78 | 22 |

A: acetonitril + 1% àcid acètic
B: aigua bidestil·lada + 1% àcid acètic

Taula 2.4 Composició de fase mòbil i condicions òptimes per separar els 11 fenols de la llista de l'EPA.

Un cop trobades les millors condicions, el següent pas fou associar cada pic cromatogràfic a un dels anàlits, realitzant injeccions de cadascun d'ells per separat. El flux de fase mòbil utilitzat és d'1 mL·min⁻¹ i, pel que fa a la detecció, una longitud d'ona de 275 nm va resultar ser la més sensible per a tots els compostos estudiats. No obstant això, 2-metil-4,6-dinitrofenol es determina a 316 nm. La raó d'aquest canvi és que, en les condicions cromatogràfiques òptimes, els pics de 2M46DNP i 24DCP apareixen solapats a 275 nm mentre que a 316 nm només es detecta el primer dels dos compostos amb una bona

sensibilitat. Així doncs, la quantificació d'aquests dos anàlits s'ha dut a terme per regressió multivariant a diferents longituds d'ona. El volum de mostra en cada injecció és de 20 μL .

La **Figura 2.2** mostra un exemple d'un cromatograma obtingut a partir de les condicions optimitzades.

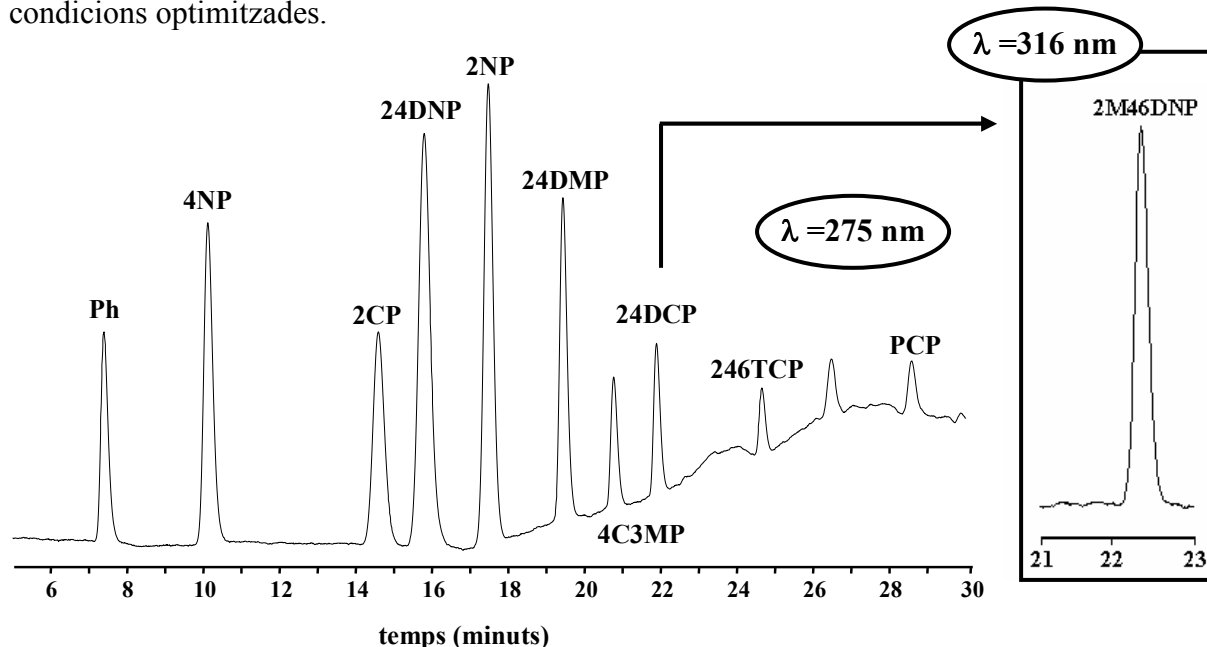


Figura 2.2 Cromatograma obtingut per a un patró dels 11 compostos fenòlics ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

El mètode cromatogràfic optimitzat s'ha caracteritzat pel que fa a intervals de linealitat, límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ), repetibilitat i reproductibilitat. Donat que en els experiments de preconcentració l'elució es va assajar tant amb acetonitril com amb metanol, s'ha cregut necessari dur a terme la caracterització del mètode cromatogràfic emprant tots dos dissolvents.

Pel que fa a l'interval de linealitat del mètode, aquest s'ha estudiat fins a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ essent conscients de que és un valor prou alt de concentració en mostres contaminades. El mètode proposat és lineal en tot el rang estudiat i per a totes les condicions provades tal com es pot veure a la **Taula 2.5**. La definició més general de límit de detecció en l'anàlisi instrumental és la concentració d'anàlit que proporciona senyal igual al senyal del blanc més tres vegades la seva desviació estàndard [55]. Però quan ens trobem davant d'un mètode cromatogràfic és difícil aconseguir un blanc que ens permeti fer aquest càlcul ja que un blanc en cromatografia implicaria disposar d'un cromatograma sense pics (sense àrees de pic per poder calcular la desviació estàndard). És per això que el mètode de càlcul de límits de detecció de mètodes cromatogràfics és objecte de discrepàncies. Alguns consideren que la millor manera és injectar els anàlits en el sistema a concentracions cada cop més baixes fins

trobar aquella en què l'alçada de pic és, com a mínim, tres vegades el soroll de fons del cromatograma al voltant del pic. Aquest mètode no és molt rigorós ja que petites variacions en el sistema poden alterar el soroll de fons d'un dia per l'altre.

| ACETONITRIL | | | | | |
|--------------------|---|---|-------------------------|---|---|
| | pendent ($\cdot 10^{-4}$) | ordenada origen ($\cdot 10^{-3}$) | r^2 | LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| 4C3MP | 6.92 \pm 0.01 | 1 \pm 2 | 0.99998 | 23 | 69 |
| 2CP | 10.47 \pm 0.03 | -4 \pm 11 | 0.99991 | 65 | 200 |
| 24DCP | 6.01 \pm 0.01 | 0 \pm 2 | 0.99997 | 59 | 180 |
| 24DMP | 9.72 \pm 0.02 | 5 \pm 3 | 0.99998 | 55 | 170 |
| 24DNP | 53.0 \pm 0.3 | -91 \pm 60 | 0.99976 | 49 | 150 |
| 2NP | 32.12 \pm 0.06 | -5 \pm 11 | 0.99997 | 18 | 56 |
| 4NP | 16.52 \pm 0.01 | -2 \pm 4 | 0.99999 | 30 | 93 |
| PCP | 1.55 \pm 0.004 | 14 \pm 1 | 0.99994 | 749 | 2297 |
| Ph | 10.11 \pm 0.02 | 3 \pm 5 | 0.99997 | 23 | 70 |
| 246TCP | 4.00 \pm 0.004 | -4 \pm 1 | 0.99999 | 25 | 76 |
| 2M46DNP | 24.9 \pm 0.3 | -26 \pm 43 | 0.99881 | 6 | 18 |

| METANOL | | | | | |
|----------------|---|---|-------------------------|---|---|
| | pendent ($\cdot 10^{-4}$) | ordenada origen ($\cdot 10^{-3}$) | r^2 | LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
| 4C3MP | 6.59 \pm 0.006 | -0.7 \pm 0.8 | 0.99999 | 38 | 118 |
| 2CP | 10.52 \pm 0.008 | 2 \pm 1 | 1.00000 | 28 | 86 |
| 24DCP | 5.96 \pm 0.005 | 1.7 \pm 0.8 | 1.00000 | 28 | 85 |
| 24DMP | 9.59 \pm 0.01 | 3 \pm 2 | 0.99999 | 24 | 74 |
| 24DNP | 35.0 \pm 0.1 | -8 \pm 12 | 0.99995 | 37 | 114 |
| 2NP | 31.27 \pm 0.02 | 1 \pm 2 | 1.00000 | 14 | 42 |
| 4NP | 16.72 \pm 0.02 | 2 \pm 4 | 0.99999 | 23 | 70 |
| PCP | 1.60 \pm 0.02 | 23 \pm 3 | 0.99891 | 1036 | 3178 |
| Ph | 10.28 \pm 0.01 | 1 \pm 1 | 0.99999 | 21 | 64 |
| 246TCP | 4.05 \pm 0.003 | -0.7 \pm 0.3 | 1.00000 | 41 | 125 |
| 2M46DNP | 24.58 \pm 0.009 | 0 \pm 2 | 1.00000 | 6 | 19 |

Taula 2.5 Paràmetres de caracterització del mètode cromatogràfic (en acetonitril i metanol)

En aquest estudi s'ha optat per calcular els límits de detecció i quantificació injectant repetidament una solució estàndard que conté els anàlits d'interès en una concentració molt pròxima al límit de detecció (solució que es considera com un blanc) i calculant la desviació

estàndard del valor de les àrees obtingudes. Els límits de detecció i quantificació es calculen multiplicant aquesta desviació estàndard de les àrees per 3.29 i 10 respectivament [56] i dividint en tots dos casos pel pendent de la corba de calibratge. Els valors obtinguts seguint aquest procediment es mostren també a la **Taula 2.5**. Els límits de detecció de tots els compostos fenòlics es troben en el rang de les ppb excepte per a pentaclorofenol que es troba en el rang de les ppm. El PCP té un temps de retenció elevat (28.5 min.) i el pic cromatogràfic que presenta és ample i de poca altura. Això provoca que la sensibilitat per a aquest compost sigui més baixa en relació a la d'altres anàlits que mostren pics més estrets.

La repetibilitat i reproductibilitat del mètode cromatogràfic s'han avaluat emprant solucions estàndard de fenols preparats en acetonitril a dues concentracions, 0.5 i 1 mg·L⁻¹. Els estudis de repetibilitat són el resultat de 5 injeccions consecutives en el sistema mentre que la reproductibilitat s'ha calculat a partir de 5 injeccions en dies consecutius. Els resultats obtinguts (**Taula 2.6**) mostren que el mètode és repetitiu, amb valors de desviació estàndard relativa inferiors al 5 % per a les dues concentracions avaluades però que, pel que fa als resultats obtinguts en dies consecutius, per a alguns compostos i a la concentració més baixa, la variabilitat obtinguda és bastant elevada. Això ens suggereix la necessitat de realitzar un calibratge cada dia abans d'analitzar les mostres.

| | repetibilitat | | reproductibilitat | |
|----------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | 0.5 mg·L ⁻¹ | 1 mg·L ⁻¹ | 0.5 mg·L ⁻¹ | 1 mg·L ⁻¹ |
| | RSD (%) | RSD (%) | RSD (%) | RSD (%) |
| 4C3MP | 2.2 | 2.6 | 5.3 | 2.7 |
| 2CP | 3.2 | 3.8 | 2.9 | 1.6 |
| 24DCP | 3.9 | 2.7 | 14.2 | 8.4 |
| 24DMP | 2.9 | 2.7 | 3.0 | 1.6 |
| 24DNP | 4.4 | 3.6 | 53.4 | 21.5 |
| 2NP | 2.0 | 1.5 | 11.9 | 2.0 |
| 4NP | 1.2 | 5.3 | 12.3 | 2.5 |
| PCP | 4.2 | 4.3 | 34.5 | 19.1 |
| Ph | 2.3 | 3.1 | 3.8 | 2.1 |
| 246TCP | 3.8 | 2.7 | 12.7 | 6.5 |
| 2M46DNP | 2.9 | 3.0 | 6.1 | 9.5 |

Taula 2.6 Estudis de repetibilitat (n=5) i reproductibilitat (n=5) del mètode cromatogràfic amb solucions estàndard dissoltes en acetonitril (RSD: desviació estàndard relativa)

2.3.2 Estudis de preconcentració de fenols amb el cartutx Spe-ed Advanta[®]

2.3.2.1 Caracterització de la matriu sòlida

El sorbent utilitzat per a l'extracció i preconcentració de compostos fenòlics presents en aigües, Spe-ed Advanta[®], és una fase sòlida polimèrica especialment preparada per a la seva utilització en la determinació de compostos fenòlics. La informació subministrada per la casa comercial és molt escassa ja que la composició del sorbent està protegida per una patent. En un primer moment van indicar que es tractava d'un copolímer de poliestirè-divinilbenzè funcionalitzat amb grups polars, però més endavant, i a causa de la nostra insistència per tal d'esbrinar el tipus de funcionalització, se'ns va informar de que potser no es tractava de poliestirè. Des de llavors no hem pogut obtenir cap més informació al respecte i l'únic que es coneix és que es tracta d'un material polimèric amb un cert grau de polaritat i que millora l'adsorció de compostos fenòlics.

A la vista de la poca informació de què disposàvem, es va decidir realitzar algunes proves sobre la fase per tal d'obtenir més dades sobre la seva composició. En primer lloc es va dur a terme un estudi per calorimetria diferencial d'escombrat (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC). La tècnica DSC estudia el comportament que segueix un polímer quan és escalfat i permet establir les transicions tèrmiques que pateix. Aquesta tècnica ens proporciona informació sobre el comportament que sofreix un polímer al escalfar-se però no és definitiva a l'hora de dur a terme una caracterització completa. En el nostre cas, el gràfic DSC obtingut per la fase sòlida comercial no segueix el comportament típic. A la corba no es detecta el salt de la línia de base característic d'una transició vítria ni el pic endotèrmic corresponent a la fusió del material. Al no detectar la fusió, el més probable és que el seu comportament tèrmic sigui proper al d'un polímer termostable. Per altra banda, es va realitzar un espectre infraroig de la fase sòlida del qual podem deduir que conté enllaços C-H aromàtics (3100-3000 cm^{-1}), grups C-H alifàtics (3000-2800 cm^{-1}) i grups C=C aromàtics (1600-1700 cm^{-1}). Els únics grups de caràcter polar que es detecten a l'espectre d'infraroig són grups carbonílics de tipus aromàtic els quals presenten una forta adsorció a 1689 cm^{-1} . D'altra banda, aquests grups carbonílics no poden associar-se a la presència de grups carboxílics ja que l'espectre IR no conté la banda característica de grups OH. A partir d'aquesta informació, doncs, no es poden treure conclusions gaire precises de la naturalesa de la fase sòlida estudiada.

La informació proporcionada pel proveïdor en quant a les propietats físiques de la fase sòlida Spe-ed Advanta[®] es resumeixen a la **Taula 2.7**.

| Paràmetre | Valor |
|-----------------------|-------------------------------------|
| forma de partícula | esfèrica |
| mida de partícula | 100 µm |
| àrea superficial | 800 m ² ·g ⁻¹ |
| dimensions dels porus | 120 Å |

Taula 2.7 Característiques físiques del sorbent Spe-ed Advanta[®]

2.3.2.2 Avaluació de les condicions d'extracció

Tal com ja s'ha comentat, la introducció d'etapes de preconcentració dels anàlits en l'anàlisi de mostres ambientals és necessària en la majoria dels casos degut a les baixes concentracions dels compostos analitzats, que sovint no són detectables directament amb els sistemes de detecció convencionals.

En aquest estudi es caracteritza un mètode d'extracció i preconcentració de compostos fenòlics presents en mostres aquoses per extracció en fase sòlida mitjançant el sorbent polimèric Spe-ed Advanta[®]. Per tal de caracteritzar el sistema s'han estudiat alguns dels paràmetres que afecten al procés SPE.

2.3.2.2.1 Estudi del cabal de càrrega

El cabal en què es passa la mostra a través de la fase sòlida és un paràmetre important quan el volum de solució és gran. Interessa sempre treballar al màxim flux possible sense que s'observin disminucions en la retenció dels anàlits per disminuir el temps de tractament de cada una de les mostres. S'han assajat diferents cabals de càrrega entre 0.5 i 30 mL·min⁻¹ i els resultats obtinguts es resumeixen a la **Figura 2.3**.

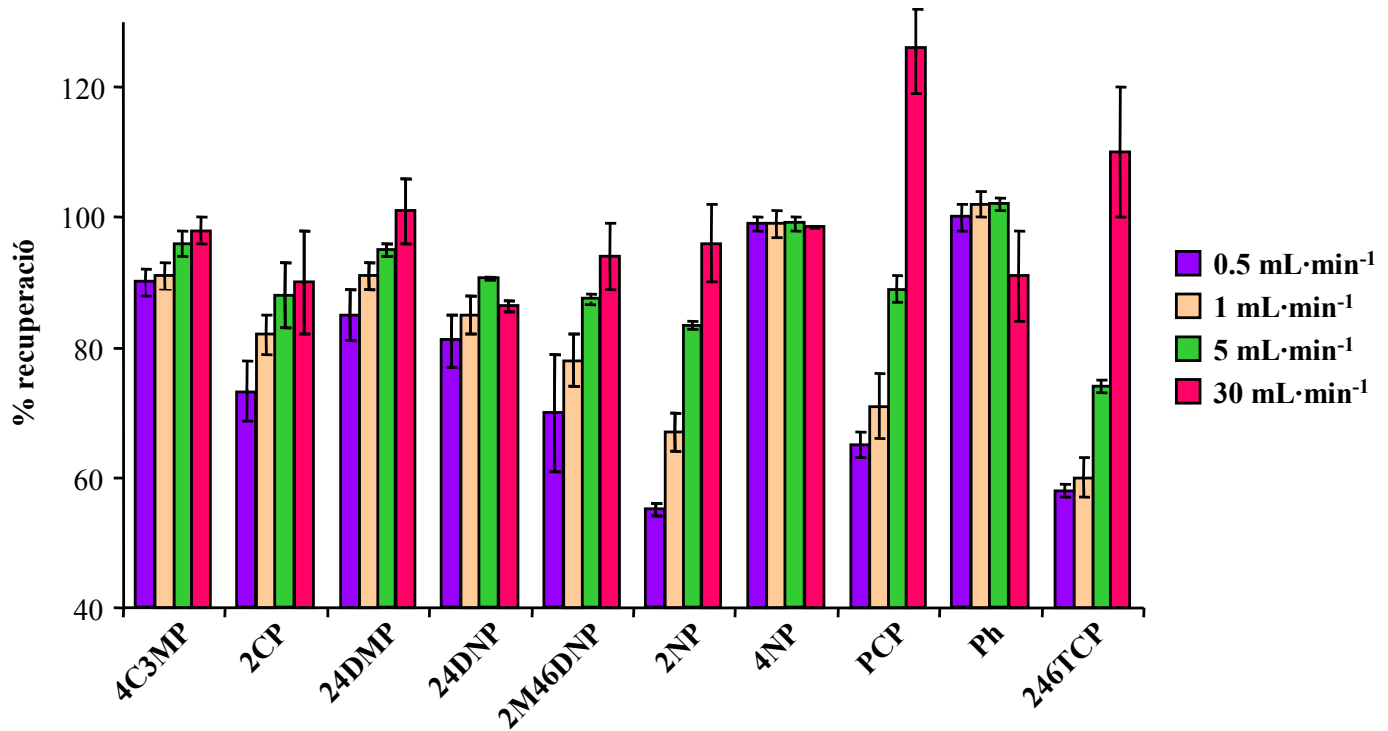


Figura 2.3 Recuperacions obtingudes (n=3) en la preconcentració de 100 mL d'aigua MilliQ fortificada a 0.05 mg·L⁻¹ i passada pel cartutx Spe-ed Advanta[®] a diferents fluxos.

La tendència general que s'observa és un augment de les recuperacions obtingudes al augmentar el flux de mostra. Una anàlisi estadística dels resultats revela que sí que s'observen diferències significatives entre els quatre valors de flux ($P < 0.05$) per tots els compostos excepte per a 4-nitrofenol ($P = 0.97$). Per a alguns compostos les diferències arriben a ser de fins al 50 % entre 0.5 i 30 mL·min⁻¹. Els resultats obtinguts són, en certa manera, contraris al que s'esperaria ja que a fluxos més baixos el temps de residència dels anàlits a la fase sòlida és més gran i seria lògic que d'aquesta manera s'incrementés l'adsorció. No obstant això, no és la primera vegada que s'obtenen aquests tipus de resultats ja que Dupeyron et al. [21] varen observar la mateixa tendència en la preconcentració de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol i pentaclorofenol en una fase copolimèrica d'estirè i divinilbenzè.

Per a cabals de càrrega iguals o superiors a 5 mL·min⁻¹ s'obtenen recuperacions entre 80-100 % per a tots els compostos, per la qual cosa a partir d'ara es treballarà per sobre d'aquest valor.

2.3.2.2.2 Influència del pH de la mostra

El fet que els compostos fenòlics tinguin propietats àcid-base fa que el pH de la mostra inicial sigui un paràmetre que s'hagi d'estudiar ja que condiciona que els anàlits es trobin en forma neutra o desprotonada. En molts casos, com per exemple les fases sòlides de sílice modificada amb cadenes C_{18} , és imprescindible acidificar les mostres a $pH \leq 2$ per tal d'obtenir retencions quantitatives dels compostos fenòlics. Per tal d'estudiar l'efecte del pH s'han preconcentrat diferents alíquotes de 100 mL d'aigua bidestil·lada fortificada amb $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per a cadascun dels compostos estudiats i a tres valors de pH. Els resultats obtinguts es recullen a la **Taula 2.8**.

| | pH=1 (n=3) | | pH=2 (n=3) | | pH=3 (n=3) | |
|----------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) |
| 4C3MP | 103 | 7 | 102 | 2 | 96 | 2 |
| 2CP | 91 | 4 | 90 | 5 | 88 | 5 |
| 24DMP | 100.2 | 0.9 | 105 | 2 | 95 | 2 |
| 24DNP | 102 | 5 | 96 | 7 | 90.6 | 0.2 |
| 2M46DNP | 95 | 4 | 95 | 2 | 87.4 | 0.6 |
| 2NP | 94 | 5 | 98 | 7 | 83.4 | 0.8 |
| 4NP | 104 | 3 | 105 | 3 | 99 | 2 |
| PCP | 110 | 30 | 100 | 11 | 89 | 3 |
| Ph | 110 | 10 | 111 | 3 | 102 | 1 |
| 246TCP | 75 | 7 | 80 | 20 | 74 | 1 |

Taula 2.8 Efecte del pH en la preconcentració de compostos fenòlics amb el cartutx Spe-ed Advanta[®]. Condicions experimentals: 100 mL aigua bidestil·lada fortificada a $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per a cada compost. (R: recuperació; RSD: desviació estàndard relativa)

Si ens fixem en els valors de la taula podem veure com, en general, les recuperacions més baixes s'obtenen al treballar a $pH=3$. Al realitzar una anàlisi estadística (ANOVA) dels resultats, no s'observen diferències significatives entre els valors obtinguts a $pH=1$ i $pH=2$ ($P=0.96$) però sí quan es tenen en compte les recuperacions obtingudes a $pH=3$ ($P<0.05$). Compostos amb valors de pK_a elevats, com per exemple 2-clorofenol ($pK_a=8.50$) o fenol ($pK_a=9.86$), no presenten diferències en les recuperacions obtingudes als tres valors de pH estudiats. Els fenols més àcids com 2,4-dinitrofenol ($pK_a=4.04$), 2-metil-4,6-dinitrofenol ($pK_a=4.42$) i pentaclorofenol ($pK_a=4.68$) mostren més diferències al valor de pH més alt degut a que en aquestes condicions es troben parcialment ionitzats. Així doncs, és necessari

treballar amb solucions ajustades a $\text{pH} \leq 2$ per tal d'obtenir les màximes recuperacions per a tots els compostos.

El comportament de la fase sòlida estudiada respecte al pH de les mostres es troba en contraposició a l'observat per a algunes fases de poliestirè-divinilbenzè les quals són capaces de preconcentrar compostos fenòlics a $\text{pH} > 7$ [15,57,58]. La menor àrea superficial del sorbent Spe-ed Advanta[®] ($800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ respecte a $>1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) podria explicar la menor retenció dels compostos més acídics quan es troben en la seva forma iònica a valors de $\text{pH} > 3$.

2.3.2.2.3 Estudi de les condicions d'elució

En l'etapa d'elució és important tenir present que l'eluent triat ha de ser capaç de trencar les interaccions existents entre els compostos fenòlics i la fase sòlida. S'ha comparat l'eficiència de dos solvents orgànics, acetonitril i metanol, per a l'elució dels compostos objecte d'estudi del sorbent Spe-ed Advanta[®] (**Taula 2.9**), essent el primer dels dos el que proporciona millors resultats en la preconcentració de 100 mL d'aigua MilliQ fortificada a $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ per a cada compost. L'anàlisi estadística de les dades confirma l'existència de diferències significatives entre els resultats obtinguts amb els dos eluents ($P < 0.05$).

| | Acetonitril (2 mL) | | Metanol (3 mL) | |
|---------|--------------------|---------|----------------|---------|
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) |
| 4C3MP | 102 | 2 | 92 | 4 |
| 2CP | 90 | 5 | 90 | 6 |
| 24DMP | 105 | 2 | 93 | 5 |
| 24DNP | 96 | 7 | 71 | 9 |
| 2M46DNP | 95 | 2 | 86 | 8 |
| 2NP | 98 | 7 | 79 | 5 |
| 4NP | 105 | 3 | 97 | 4 |
| PCP | 100 | 10 | 60 | 10 |
| Ph | 111 | 3 | 99 | 5 |
| 246TCP | 80 | 20 | 74 | 9 |
| 24DCP | n.d. | n.d. | 96 | 3 |

Taula 2.9 Comparació de l'eficiència d'acetonitril i metanol per eluir els compostos fenòlics ($n=3$). Condicions experimentals: 100mL aigua MilliQ, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ per a cada compost. (n.d.: no determinat; R: recuperació; RSD: desviació estàndard relativa)

Un altre inconvenient derivat de l'ús de metanol és el volum d'elució necessari per tal de recuperar quantitativament tots els compostos (3 mL) mentre que, amb acetonitril, tots ells

excepte 2,4-dinitrofenol, 2,4,6-triclorofenol i 2,4-diclorofenol, que necessiten 2 mL, poden ser eluïts amb 1 mL. El fet que el volum d'elució necessari per recuperar quantitativament tots els compostos sigui baix és molt positiu perquè es poden obtenir factors de concentració elevats si és possible preconcentrar volums grans de mostra sense arribar al volum de ruptura de la fase sòlida. En conclusió, es fixa en 2 mL d'acetonitril el volum òptim per tal de dur a terme l'elució.

2.3.2.2.4 Efecte del volum i la concentració de la mostra

Una vegada estudiats els diferents paràmetres que poden afectar l'adsorció i elució dels anàlits amb Spe-ed Advanta[®] s'avalua l'eficiència del cartutx mitjançant la preconcentració de volums de 0.1 a 1 L d'aigua MilliQ fortificada amb els 11 compostos fenòlics a nivells de 10, 5, 2 i 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. S'obtenen recuperacions quantitatives per a totes les condicions avaluades tal com es pot veure a la **Taula 2.10**.

| | Recuperació (%) | | | | | |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | 100 mL | 500 mL | | | | 1 L |
| | 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 4C3MP | 96 ± 9 | 93 ± 4 | 97 ± 5 | 100 ± 10 | 90 ± 10 | 104 ± 3 |
| 2CP | 99 ± 8 | 88.2 ± 0.5 | 92 ± 6 | 99 ± 5 | 83 ± 6 | 102.9 ± 0.1 |
| 24DMP | 110 ± 20 | 97 ± 3 | 102 ± 6 | 110 ± 10 | 104 ± 8 | 100 ± 5 |
| 24DNP | 100 ± 10 | 70 ± 20 | 67 ± 8 | 80 ± 30 | 78 ± 8 | 80 ± 10 |
| 2M46DNP | 100 ± 10 | 82 ± 8 | 86 ± 8 | 90 ± 30 | 96 ± 8 | 106 ± 5 |
| 2NP | 90 ± 10 | 87 ± 3 | 88 ± 5 | 100 ± 10 | 100 ± 20 | 104 ± 1 |
| 4NP | 113 ± 8 | 100 ± 3 | 101 ± 3 | 114 ± 6 | 119 ± 2 | 102 ± 3 |
| PCP | < LOQ | 88 ± 9 | 110 ± 20 | < LOQ | < LOQ | < LOQ |
| Ph | 112 ± 8 | 90 ± 10 | 92 ± 5 | 110 ± 10 | 107 ± 6 | 99 ± 7 |
| 246TCP | 91 ± 10 | 81 ± 2 | 89 ± 4 | 100 ± 10 | 100 ± 2 | 93 ± 4 |
| 24DCP | 88 ± 6 | 100 ± 10 | 100 ± 10 | 100 ± 20 | 130 ± 30 | 110 ± 1 |

Taula 2.10 Recuperacions obtingudes en la preconcentració de diferents volums de solució de fenols i a diferents concentracions (en tots els casos n=3) (LOQ: límit de quantificació).

Amb tots els volums de mostra passats pel cartutx s'obtenen retencions al voltant del 100 % per a tots els anàlits. Això indica que no s'ha assolit el seu volum de trencament en cap cas. En alguns casos, no s'han pogut obtenir resultats per al pentaclorofenol degut als seus elevats límits de detecció i quantificació.

Pel que fa a la concentració, no té sentit treballar amb nivells més elevats tenint en compte que els nivells de compostos fenòlics que es poden trobar com a contaminants de les aigües, per norma general, no excediran mai, excepte en el cas de vessaments directes molt greus, els valors estudiats.

Els resultats indiquen que els factors de preconcentració que s'obtenen són molt elevats ja que es pot analitzar, sense pèrdues d'eficiència, volums de fins a 1 L de mostra eluint quantitativament els anàlits amb només 2 mL d'acetonitril.

2.3.2.3 Aplicació del mètode a aigües naturals

S'ha aplicat la metodologia desenvolupada a l'anàlisi d'una aigua natural del riu Ter (Girona), la qual s'ha caracteritzat a partir de la determinació dels paràmetres següents: oxidabilitat amb permanganat, concentració d'anions (clorurs, nitrats, sulfats i fosfats) per electroforesi capil·lar, concentració de cations (sodi, potassi, calci i magnesi) mitjançant ICP-AES, pH i conductivitat. Aquestes característiques es detallen a la **Taula 2.11**. De tots els valors que es poden veure a la taula destaca el seu elevat contingut en matèria orgànica (58.1 mg·L⁻¹).

| Paràmetre | Unitats | Valor |
|----------------------------------|--------------------|-------|
| pH | | 7.94 |
| conductivitat | μS | 721 |
| oxidabilitat | mg·L ⁻¹ | 58.1 |
| [Cl ⁻] | mg·L ⁻¹ | 48.1 |
| [NO ₃ ⁻] | mg·L ⁻¹ | 16.5 |
| [SO ₄ ²⁻] | mg·L ⁻¹ | 110.1 |
| [PO ₄ ³⁻] | mg·L ⁻¹ | 71.0 |
| [Na ⁺] | mg·L ⁻¹ | 23.9 |
| [K ⁺] | mg·L ⁻¹ | 1.4 |
| [Ca ²⁺] | mg·L ⁻¹ | 102.9 |
| [Mg ²⁺] | mg·L ⁻¹ | 13.0 |

Taula 2.11 Característiques de l'aigua natural avaluada en aquest estudi.

Un cop caracteritzada l'aigua i filtrada per tal d'eliminar les partícules en suspensió, es fortifica a dos nivells de concentració: 2 i 0.5 μg·L⁻¹. Volums de 0.5-1 L d'aquesta aigua es preconcentren en el cartutx Spe-ed Advanta[®] i els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 2.12**. Quan el volum de mostra analitzat és de 0.5 L, les recuperacions són quantitatives i amb

valors de desviació estàndard relativa acceptables per als dos nivells de concentració. No obstant, al passar per la fase sòlida 1 L de mostra d'aigua natural fortificada a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, les recuperacions obtingudes per a alguns dels compostos (4C3MP, 2CP i 24DNP) es redueixen a valors inferiors a 50 %. Aquest fet es pot explicar per l'elevada presència d'àcids húmics i fúlvics a la mostra, els quals també tenen anells benzènics i grups fenòlics i poden ser coextrets amb els anàlits. L'efecte de la presència d'aquestes substàncies es veu incrementat quan els volums de mostra que es tracten són grans degut a que la quantitat de matèria orgànica present és prou important com per saturar el cartutx i evitar que s'hi adsorbeixin totalment els anàlits. De fet, aquesta retenció de les substàncies húmiques es pot observar de forma experimental a través de l'enfosquiment de la fase sòlida. A més, la presència dels àcids húmics i fúlvics provoca l'aparició d'una banda ampla a l'inici dels cromatogrames que dificulta la quantificació dels anàlits que presenten temps de retenció baixos com el fenol tal com es pot observar a la **Taula 2.12**, on es pot veure que no podem determinar aquest compost quan la seva concentració a la mostra és de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

| | Condicions experimentals | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|
| | 500 mL | | | | 1 L | |
| | $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | | $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | | $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | |
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) |
| 4C3MP | 97 | 3 | 90 | 6 | 53 | 20 |
| 2CP | 106 | 5 | 96 | 7 | 46 | 17 |
| 24DMP | 102 | 3 | 105 | 5 | 80 | 6 |
| 24DNP | 89.5 | 0.2 | 110 | 30 | 42 | 9 |
| 2M46DNP | 97 | 2 | 100 | 10 | 120 | 10 |
| 2NP | 96 | 4 | 106 | 3 | 109.7 | 0,1 |
| 4NP | 105 | 2 | 116 | 2 | 160 | 14 |
| Ph | 122 | 5 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 246TCP | 91 | 4 | 87 | 6 | 144 | 15 |
| 24DCP | 103 | 7 | 150 | 10 | 135 | 16 |

Taula 2.12 Recuperacions obtingudes (n=3) en l'anàlisi d'aigües naturals del riu Ter. (R: recuperació; RSD: desviació estàndard relativa; n.d.: no determinat).

2.3.3 Avaluació d'altres sorbents per a la preconcentració de fenols

L'eficiència del nou cartutx, Spe-ed Advanta[®], s'ha comparat amb la que proporcionen altres sorbents àmpliament utilitzats en la preconcentració de compostos fenòlics. En primer

lloc, s'ha utilitzat una fase sòlida de sílice modificada amb cadenes C_{18} . Per a aquest experiment s'ha utilitzat 100 mL d'aigua natural del riu Ter ajustada a $\text{pH}=2$ i fortificada amb $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per a cadascun dels fenols. Els resultats aconseguits es comparen amb els obtinguts en les mateixes condicions amb el sorbent Spe-ed Advanta[®]. A la **Figura 2.4** es poden veure, superposats, els cromatogrames obtinguts per als dos casos, on s'observa clarament que la fase de sílice- C_{18} proporciona àrees de pic menors (i per tant, menors recuperacions) per als compostos més polars (Ph, 4NP i 2CP), mentre que els resultats obtinguts per als altres compostos usant els dos sorbents són comparables.

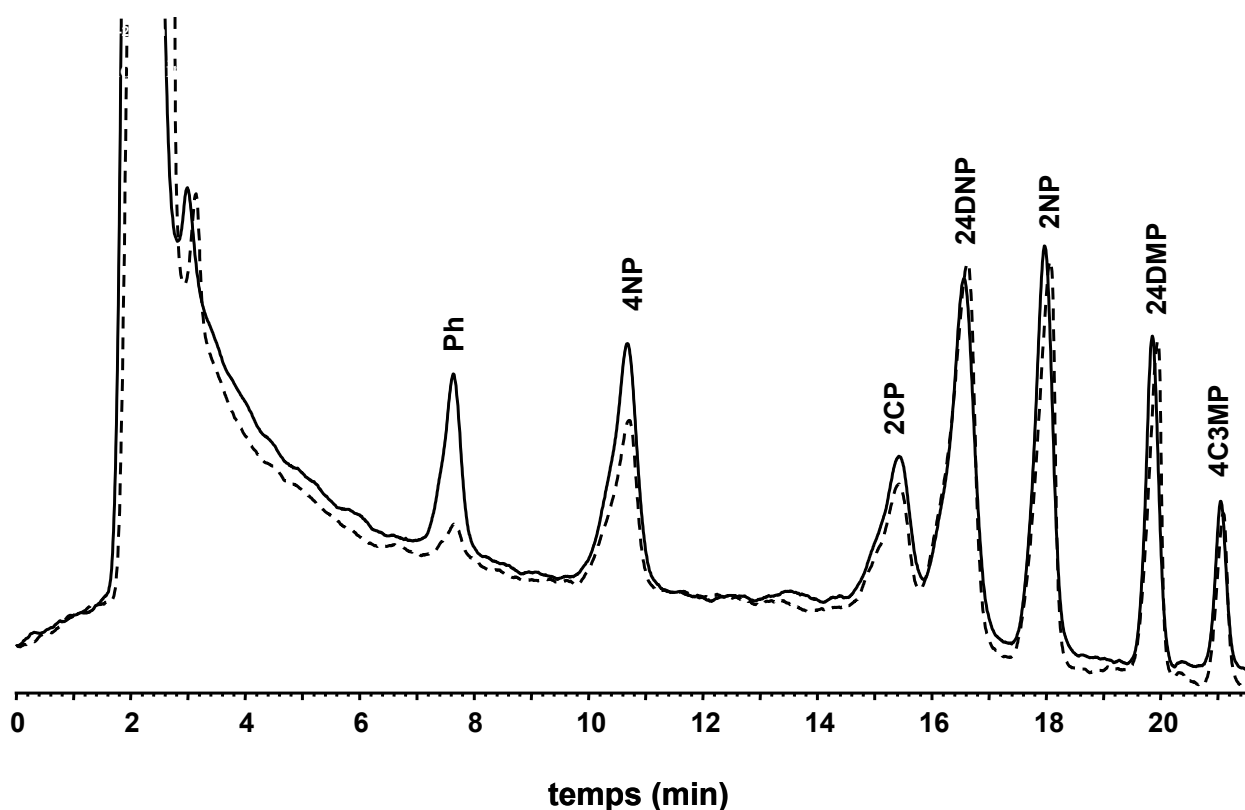


Figura 2.4 Cromatogrames obtinguts després de preconcentrar els fenols en un cartutx C_{18} (línia discontinua) i en el cartutx Spe-ed Advanta[®] (línia contínua). Condicions experimentals: 100 mL aigua natural fortificada a $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

En aquest cas, els resultats que s'obtenen coincideixen amb els obtinguts en treballs previs que utilitzen fase sòlides de sílice- C_{18} donat que aquest tipus de fases proporcionen bones recuperacions per als compostos fenòlics més hidrofòbics mentre que presenten valors baixos de recuperació per als compostos més polars.

També s'ha estudiat l'eficiència de dos sorbents polimèrics comercials en la preconcentració de fenols: una fase de poliestirè-divinilbenzè (*Bakerbond SDB-1*) i una de divinilbenzè-N-vinilpirrolidona (*Oasis HLB*) i els resultats obtinguts s'han comparat amb els

que ens proporciona el sorbent avaluat en aquest capítol en les mateixes condicions experimentals. En aquest cas, es precentren 100 mL d'aigua MilliQ fortificada a 0.05 mg·L⁻¹ per a cadascun dels compostos fenòlics objecte d'estudi i a pH=3. Els resultats es resumeixen a la **Taula 2.13**.

| | % recuperació | | | | |
|----------------|----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------|
| | Spe-ed Advanta (n=3) | | Bakerbond SDB-1 (n=3) | | Oasis HLB (n=1) |
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) | |
| 4C3MP | 96 | 2 | 94 | 4 | 85 |
| 2CP | 88 | 5 | 96 | 8 | 86 |
| 24DMP | 95 | 2 | 90 | 3 | 59 |
| 2M46DNP | 87.4 | 0.6 | 76 | 8 | 74 |
| 2NP | 83.4 | 0.8 | 85 | 2 | 83 |
| 4NP | 99 | 2 | 96 | 8 | 99 |
| Ph | 89 | 3 | 101 | 1 | 112 |
| 246TCP | 102 | 1 | 78 | 5 | 72 |
| PCP | 74 | 1 | 112 | 10 | 103 |

Taula 2.13 Comparació dels resultats obtinguts en la preconcentració de compostos fenòlics amb diferents adsorbents.

En comparar els resultats obtinguts amb Spe-ed Advanta[®] i els de la fase de poliestirè-divinilbenzè, podem veure que són similars per a molts dels compostos. Per alguns d'ells, els resultats amb Bakerbond SDB-1 són millors que amb Spe-ed Advanta[®] però s'ha de tenir en compte que, per a aquest últim, els resultats que es mostren a la taula no corresponen als de les millors condicions ja que ja hem vist que és necessari acidificar la mostra a pH≤2. Aquests experiments s'han dut a terme abans de realitzar l'optimització del pH per a aquest sorbent. Pel que fa al cartutx Oasis HLB, aquest proporciona resultats acceptables per a la majoria de compostos però que són, en molts dels casos, inferiors als obtinguts amb la fase que s'està estudiant.

Com a conclusió podem dir que el nou sorbent Spe-ed Advanta[®] és adient per a l'extracció i preconcentració de compostos fenòlics presents en mostres aquoses a nivells de traça amb eficiències similars, i en alguns casos superiors, a les que s'obtenen amb altres fases sòlides estudiades.

2.4 REFERÈNCIES

1. M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3.
2. E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-phase extraction. Principles and practice*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1998), ISBN 0-471-61422-X.
3. M.T. Galceran, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 75.
4. R. Schilling, P.J. Clarkson, M. Cooke, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 90.
5. T. Galeano Diaz, A. Guiberteau, J.M. Ortiz, M.D. López, F. Salinas, *Chromatographia* 53 (2001) 40.
6. R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 179.
7. I. Rodríguez, M.P. Llompart, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 291.
8. T.M. Pizzolato, J.L. Foschiera, E. Benvenuti, F. Gomes, A.M. Geller, A. Lopes, M.doC. Ruaro Peralba, J.H.Z. dos Santos, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1180.
9. Y. Fan, Y.-Q. Feng, S.-L. Da, P.-Y. Feng, *Anal. Sci.* 19 (2003) 709.
10. Y. Fan, Y.-Q. Feng, S.-L. Da, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 145.
11. F. Abu-Shammala, *Anal. Lett.* 32 (1999) 3083.
12. R. Wissiack, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 159.
13. P. López-Roldán, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 599.
14. N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 547.
15. V. Pichon, C. Cau Dit Coumes, L. Chen, S. Guenu, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 25.
16. M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 301.
17. S. Morales, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 95.
18. L.A. Reitzel, A. Ledin, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 175.
19. N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 50 (1999) 21.
20. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 257.
21. S. Dupeyron, M. Astruc, M. Marbach, *Analisis* 23 (1995) 470.
22. M.A. Crespín, E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 165.
23. Y. Chung, K. Lee, *Microchem. J.* 69 (2001) 143.
24. M.L. Davì, F. Gnudi, *Water Res.* 33 (1999) 3213.

25. L.E. Sojo, J. Djauhari, J. Chromatogr. A 840 (1999) 21.
26. N. Masqué, E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia 47 (1998) 176.
27. B. Gawzkik, M. Sobiesiak, A.M. Puziy, O.I. Poddubnaya, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 27 (2004) 1027.
28. N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *New materials with hydrophilic character for solid-phase extraction*, Trends Anal. Chem., pendent de publicació.
29. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, TrAC, Trends Anal. Chem. 17 (1998) 384.
30. N. Cardellicchio, S. Cavalli, V. Piangerelli, S. Giandomenico, P. Ragone, Fresenius J. Anal. Chem. 358 (1997) 749.
31. J.J. Sun, J.S. Fritz, J. Chromatogr. 590 (1992) 197.
32. N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, Analyst 122 (1997) 425.
33. K. Eder, M.R. Buchmeiser, G.K. Bonn, J. Chromatogr. A 810 (1998) 43.
34. P.J. Dumont, J.S. Fritz, J. Chromatogr. A 691 (1995) 123.
35. J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou, J. Chromatogr. A 904 (2000) 171.
36. D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, Chromatographia 53 (2001) 113.
37. S. Lacorte, D. Fraisse, D. Barceló, J. Chromatogr. A 857 (1999) 97.
38. A. Latorre, S. Lacorte, D. Barceló, Chromatographia 57 (2003) 111.
39. N. Fontanals, P. Puig, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A 1035 (2004) 281.
40. N. Fontanals, R.M. Marcé, M. Galià, F. Borrull, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 41 (2003) 1927.
41. N. Fontanals, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 63.
42. N. Fontanals, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia 60 (2004) 511.
43. N. Fontanals, R.M. Marcé, M. Galià, F. Borrull, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 42 (2004) 2019.
44. H. Bagheri, M. Saraji, J. Chromatogr. A 986 (2003) 111.
45. H. Bagheri, M. Saraji, J. Chromatogr. A 910 (2001) 87.
46. H. Bagheri, A. Mohammadi, J. Chromatogr. A 1015 (2003) 23.
47. H. Bagheri, A. Mohammadi, A. Salemi, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 445.
48. N. Fontanals, J. Cortés, M. Galià, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, F. Borrull, D.C. Sherrington, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. (2004) en premsa.

-
49. N. Fontanals, M. Galià, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, D.C. Sherrington, F. Borrull, *Evaluation of a new hypercrosslinked polymer as a sorbent for solid-phase extraction of polar compounds*, J. Chromatogr. A, pendent de publicació.
 50. M. Hrubý, J. Hradil, M.J. Benes, React. Funct. Polym. 59 (2004) 105.
 51. E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, J. Chromatogr. A 995 (2003) 233.
 52. C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, C. Tozzi, J. Chromatogr. B 804 (2004) 31.
 53. F. Navarro-Villoslada, B. San Vicente, M.C. Moreno-Bondi, Anal. Chim. Acta 504 (2004) 149.
 54. J.S. Fritz, *Analytical solid-phase extraction*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1999), ISBN 0-471-24667-0.
 55. J.N. Miller, J.C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Pearson Educación S.A., Madrid (Espanya) (2002), ISBN 0-13-022888-5.
 56. G. Ramis-Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, *Quimiometría*, Ed. Síntesis, Madrid (Espanya) (2001) ISBN 84-7738-904-7.
 57. C.W. Thorstensen, O. Lode, A.L. Christiansen, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5829.
 58. S. Moret, J.M. Sánchez, V. Salvadó, M. Hidalgo, J. Chromatogr. A, *submitted*.

CAPÍTOL 3

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE FENOLS BROMOSUBSTITUÏTS I COMPOSTOS BISFENÒLICS EN AIGÜES

| | |
|---|------------|
| 3.1 INTRODUCCIÓ | 97 |
| 3.1.1 Acoblament GC-MS | 98 |
| 3.1.1.1 Tipus d'analitzadors en GC-MS..... | 100 |
| 3.1.1.1.1 La trampa d'ions | 101 |
| 3.1.1.2 GC-MS en mode tàndem (GC-MS/MS)..... | 104 |
| 3.1.2 Derivatització en cromatografia de gasos..... | 107 |
| 3.1.2.1 Mètodes de derivatització de compostos fenòlics | 109 |
| 3.1.3 Compostos fenòlics estudiats..... | 115 |
| 3.2 EXPERIMENTAL | 116 |
| 3.2.1 Reactius..... | 116 |
| 3.2.2 Aparells i materials | 117 |
| 3.2.3 Procediment experimental | 118 |
| 3.2.3.1 Anàlisi de compostos fenòlics | 118 |
| 3.2.3.2 Preconcentració per extracció en fase sòlida..... | 118 |
| 3.2.3.3 Derivatització de compostos fenòlics..... | 119 |
| 3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ | 120 |
| 3.3.1 Caracterització del mètode cromatogràfic | 120 |
| 3.3.1.1 Condicions de treball en MS/MS | 123 |
| 3.3.2 Optimització del mètode de derivatització | 126 |
| 3.3.3 Preconcentració de compostos fenòlics per SPE..... | 138 |
| 3.4 REFERÈNCIES | 142 |

3.1 INTRODUCCIÓ

L'anàlisi de compostos orgànics presents en matrius complexes, ja sigui líquides o sòlides, no és un procés senzill degut a la gran varietat de substàncies interferents que aquestes poden contenir. En molts casos, l'aplicació d'etapes de *clean-up* i els mètodes de detecció convencionals no són suficients per aconseguir una bona separació i quantificació d'aquests compostos.

L'aparició de l'espectrometria de masses a principis del segle XX i, sobretot, la seva aplicació, ja a mitjans de segle, com a mètode de detecció acoblat a la cromatografia de gasos (GC-MS), va suposar un gran pas endavant en molts camps de l'anàlisi, entre els quals es troba l'anàlisi ambiental, ja que introduïa, a més d'una major sensibilitat en la separació i quantificació de compostos orgànics, la possibilitat de dur a terme la seva identificació estructural. L'acoblament de l'espectrometria de masses a la cromatografia líquida (LC-MS) també ha estat possible però es tracta d'una unió més recent que es troba en una fase aguda

de desenvolupament degut a la seva complexitat, el que va provocar una major reticència per part dels científics a ser utilitzada en un principi. Ambdós acoblaments, però, han esdevingut o van esdevenint cada cop més una eina de treball molt habitual en molts laboratoris.

Tot i que en el capítol anterior s'ha desenvolupat una metodologia basada en la cromatografia líquida per a la determinació de compostos fenòlics en aigües, les propietats de polaritat i volatilitat d'aquests compostos fan que puguin ésser analitzats també per cromatografia de gasos. Concretament en aquest capítol s'avaluarà un mètode per a la determinació de fenols bromo-derivats i compostos bisfenòlics de tipus A en aigües utilitzant l'acoblament cromatografia de gasos/espectrometria de masses (GC-MS).

3.1.1 Acoblament GC-MS

L'acoblament de la cromatografia de gasos a l'espectrometria de masses és la tècnica més emprada actualment per a l'anàlisi de contaminants orgànics volàtils presents en mostres ambientals. Aquestes dues tècniques presenten algunes limitacions quan són utilitzades per separat. Per una banda, la GC és capaç de separar els components d'una mescla de forma efectiva però el seu problema principal és la falta de proves definitives sobre la naturalesa dels compostos separats. Per a molts detectors de cromatografia de gasos, la identificació es basa únicament en la comparació de temps de retenció i el problema apareix quan diferents anàlits i interferències tenen temps de retenció similars. Un espectròmetre de masses fragmenta les molècules dels anàlits injectats i registra un espectre dels fragments que és característic per a cada un d'ells i que es pot comparar amb espectres teòrics presents en llibreries. És una eina molt útil per identificar clarament l'estructura d'un compost però és més complex quan es volen identificar els components d'una mescla [1]. El gran nombre d'aplicacions de l'acoblament és, doncs, el resultat de la combinació, per una banda, de l'eficiència de la separació en GC i, per l'altra, la correcta informació qualitativa i elevada sensibilitat proporcionades per l'espectrometria de masses [2].

Per tal que l'acoblament GC-MS sigui possible s'ha de disposar d'una interfase capaç de transferir els compostos procedents de la columna cromatogràfica cap a la font d'ions del sistema MS sense pèrdues en l'eficàcia de la separació aconseguida en el sistema GC. La transferència de la mostra al sistema MS s'ha de produir sense alterar les condicions de buit que són necessàries a la font d'ions i sense que es pateixin pèrdues dels anàlits que afectin a la seva quantificació. Aquesta transferència, que té lloc en fase gasosa, condiona que la

interfase es trobi a una certa temperatura, però adequada perquè no provoqui la descomposició dels compostos termolàbils ni pèrdues de les substàncies més volàtils. Els fluxos baixos de fase mòbil utilitzats en cromatografia gasosa capil·lar, de 0.5 a 2 mL·min⁻¹, permeten que l'acoblament GC-MS es pugui dur a terme de forma directa sense repercutir en el sistema de buit de l'aparell. Aquest és un dels principals avantatges de la GC-MS respecte a la LC-MS, la qual precisa d'interfases molt més complexes que han de volatilitzar la mostra abans de produir la seva ionització. Un segon model d'interfase conegut com a *open-split* restringeix el flux de fase mòbil que entra al sistema. Aquest model conté un punt de *split* en el qual part del flux que prové de la columna cromatogràfica entra al sistema MS mentre que hi ha una altra part que s'evacua o s'utilitza per quantificar la mostra per mitjà d'un altre detector. El fet que l'entrada al sistema MS sigui constant permet canviar les característiques del sistema GC (e.g., longitud i diàmetre de la columna, flux de fase mòbil) per millorar l'eficàcia de la separació sense que això repercuteixi en l'espectròmetre de masses. El punt de *split*, el qual es troba a pressió atmosfèrica, s'ha de purgar amb heli per evitar l'entrada d'aire a la font d'ions, que es manté en condicions de buit. Un altre avantatge d'aquest model d'interfase és la possibilitat de discriminar entre els compostos que ens interessa quantificar i els que no volem que entrin al sistema (e.g., solvent, interferències) [3].

Un cop introduïts a la font d'ions, els anàlits són ionitzats per un procés que es pot aconseguir, principalment, per mitjà de dos mecanismes diferents. En la ionització per **impacte electrònic** (EI) es bombardegen les molècules dels anàlits (M) amb electrons d'energia elevada. Inicialment es produeix la formació d'un ió molecular (M⁺) per pèrdua d'un electró però, a la vegada, M⁺ pot ser més o menys fragmentat en funció de l'energia residual i la capacitat de la molècula per estabilitzar els diferents fragments. Així, un mateix anàlit en unes mateixes condicions d'ionització donarà lloc a un patró de fragmentació característic (espectre de masses) que permetrà la seva identificació per comparació d'aquest patró amb els espectres teòrics proporcionats per les llibreries. Per altra banda, la **ionització química** (CI) utilitza gasos reactius, tal com metà, butà o diòxid de carboni, les molècules dels quals són les primeres en rebre l'impacte dels electrons d'elevada energia i ser ionitzades. En un segon pas, aquestes molècules de gas reactiu col·lisionen amb els anàlits i els transmeten el seu excés d'energia per mitjà de processos químics que poden conduir a la formació tant d'ions positius com negatius. Un cop formats, aquests ions poden o no patir fragmentació però, en general, apareixeran inalterats o poc fragmentats en l'espectre de masses. Això es degut a que l'energia associada als processos d'ionització química es troba a nivells molt per sota a la implicada en els mecanismes d'impacte electrònic.

Totes les espècies ionitzades formades a la font d'ions pateixen l'efecte d'un potencial d'acceleració que les transporta cap a l'analitzador, que és la part del sistema on es produirà la separació de les substàncies en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z).

3.1.1.1 Tipus d'analitzadors en GC-MS

L'analitzador és la part de l'espectròmetre de masses on es produeix la separació dels ions en funció de la seva relació m/z . N'existeixen diferents tipus que es diferencien entre sí en la forma que tenen de discriminar els ions formats. Els analitzadors més habituals són el quadrupol, l'analitzador de sectors magnètics, la trampa iònica i l'analitzador de temps de vol.

El **quadrupol** consisteix en quatre barres situades en paral·lel entre si, a la mateixa distància entre elles, i situades en els quatre cantons d'un quadrat. Les quatre barres es troben connectades dos a dos en diagonal elèctricament i a un generador de radiofreqüència que combina un corrent directe (U) i un corrent altern (V). Quan els voltatges directe i altern es sobreposen entre els parells de barres, només seran capaços de travessar l'analitzador aquells ions que es trobin en ressonància amb el camp de radiofreqüència resultant, fet que dependrà de la seva relació m/z . Els ions que no estiguin en ressonància adoptaran trajectòries inestables i no aconseguiran travessar l'analitzador i arribar al detector. Fent un escombrat de U i V aconseguirem establir, de forma gradual, els ions d'una determinada m/z de manera que ions amb diferent m/z arribaran al detector a diferents temps i els haurem aconseguit separar [4].

L'analitzador de **sectors magnètics** utilitza un imant permanent per fer que el feix d'ions procedent de la font es mogui en una trajectòria circular de 180, 90 o 60 graus. La trajectòria descrita en un sector per ions d'una massa i càrrega determinada depèn de dues forces que pateixen aquests ions: la força magnètica (F_M) provocada per la presència d'un camp magnètic, que depèn de la força del camp (B), de la velocitat del ió (v) i de la seva càrrega (z), i la força centrípeta (F_C) que depèn de la massa del ió (m), de la seva velocitat i del radi de curvatura del sector magnètic (r). Per tal que un ió sigui capaç de travessar el sector i arribar al detector és necessari que F_M i F_C siguin iguals. La separació dels diferents ions es pot aconseguir fent variar una de les tres variables, B , V i r i mantenint les altres dues constants. Els espectròmetres de masses de sectors més moderns contenen un electroimant en el que els ions es separen mantenint V i r constants mentre es varia el corrent a l'imat, o sigui, B . Fins ara s'ha suposat que ions amb una mateixa càrrega tenen la mateixa energia cinètica després de ser accelerats, independentment de la seva massa. Aquesta suposició

només és aproximada ja que els ions posseeixen una distribució estadística de velocitats (rapidesa i direcció) que es reflectirà en una distribució similar, tant en energia com en direcció, que conduirà a pèrdues de resolució. Per corregir aquestes aberracions direccionals i d'energia en una població d'ions s'apliquen els anomenats **sectors de doble enfocament** que consten de la combinació d'un sector magnètic i un sector electrostàtic. Aquest últim és l'encarregat de limitar, per una banda, l'energia cinètica dels ions a un interval definit exactament de manera que es discriminen els ions amb energies més grans i més petites que la mitjana, i, per l'altra, també produeix un enfocament direccional, de manera que només els ions d'una determinada m/z són doblement enfocats per un V i un B donats i són els que arribaran al detector [5].

Un altre tipus d'analitzador és l'**analitzador lineal de temps de vol**. En ell, els ions són expulsats de la font en feixos, són accelerats per un potencial V i recorren una distància d abans d'arribar al detector. En funció de la seva relació m/z , el temps que tardaran en travessar la distància d serà diferent. Així, ions més petits assoliran més ràpid el detector. El principal inconvenient d'aquests analitzadors és la seva baixa resolució provocada per factors que creen una distribució de temps de vol entre ions d'igual m/z . Una solució per augmentar la resolució és allargar l'espai que els ions han de recórrer (d) i això s'aconsegueix amb un reflectró [6].

L'últim analitzador que queda per comentar és la **trampa d'ions**. Al ser l'utilitzat en aquest treball, aquest s'explicarà de forma més extensa en el següent apartat.

3.1.1.1.1 La trampa d'ions

Podem imaginar la trampa d'ions com un quadrupol inclinat sobre si mateix de manera que es forma una cavitat tancada. De les quatre barres del quadrupol, la més interna es redueix a un punt al centre de la trampa, la més externa forma l'elèctrode circular central i les altres dues barres formen els elèctrodes que fan de caps (elèctrodes d'entrada i de sortida). Tot i que físicament són similars, els principis que regeixen el funcionament d'ambdós analitzadors són diferents. Pel que fa a la ionització amb la trampa d'ions, aquesta pot ser externa, si l'espectròmetre conté una font EI o CI convencionals, o interna, si la ionització té lloc a la pròpia trampa a través d'un filament de tungstè que emet contínuament electrons. Aquesta font interna es troba separada del cos de la trampa iònica a través d'unes lents d'entrada que poden adoptar càrrega positiva de manera que els electrons són atrets, entren a la cavitat i ionitzen la mostra o càrrega negativa i així els electrons són repel·lits i no té lloc ionització de

la mostra. Als ions, un cop dins la trampa d'ions, se'ls apliquen simultàniament un corrent directe (DC) i un corrent de radiofreqüència (RF) de manera que s'aconsegueix "atrapar-los" en òrbites estables (**Figura 3.1**)

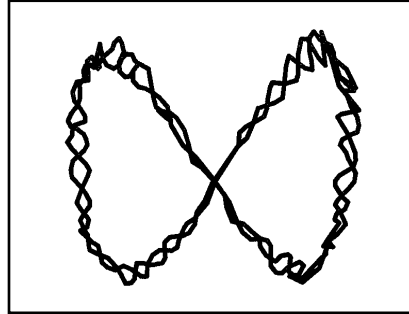


Figura 3.1 Trajectòria que segueix un ió a l'interior d'una trampa iònica.

Aquestes òrbites que adopten els ions dins la trampa es poden desestabilitzar per xocs amb altres ions existents. La presència de gas heli és necessària perquè redueix l'excés d'energia cinètica dels ions i es disminueix el nombre de xocs, a la vegada que les òrbites es fan més petites, els ions d'una mateixa m/z queden més agrupats i, a l'hora de desestabilitzar-los, aniran més junts cap al detector, obtenint millors resolucions. Un inconvenient associat a la presència d'heli dins la trampa d'ions és que provoca la pèrdua d'una mica de buit.

Un cop atrapats, tots els ions creats en un període de temps concret són expulsats seqüencialment de la trampa aplicant un escombrat de radiofreqüència que provoca la desestabilització de les òrbites dels ions en ordre creixent de relació m/z .

El moviment d'un ió en un camp de radiofreqüència oscil·lant es pot descriure mitjançant l'equació de Mathieu (1)

$$\frac{d^2U}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cdot \cos 2\xi)U = 0 \quad (1)$$

u representa les coordenades x , y i z

$\xi = \Omega t / 2$ (Ω = freqüència radial)

a_u i q_u són paràmetres adimensionals coneguts com a paràmetres d'atrapament.

Després d'una sèrie de transformacions sobre aquesta equació es pot arribar a unes expressions dels paràmetres a i q (2).

$$a_r = \frac{8zU}{m r_0^2 \Omega^2} \quad q_r = \frac{-4zV}{m r_0^2 \Omega^2} \quad (2)$$

En una trampa, $a_x=a_y=a_r=-2a_z$ i $q_x=q_y=q_r=2q_z$, per tant,

$$a_z = \frac{-16 z U}{m r_0^2 \Omega^2} \quad q_z = \frac{8 z V}{m r_0^2 \Omega^2} \quad (3)$$

Moltes trampes iòniques comercials operen amb $U=0$ per la qual cosa $a_z=0$. L'expressió per a q_z conté la relació m/z , les dimensions de la trampa iònica (r_0), l'amplitud del potencial de radiofreqüència (V) i la freqüència angular del potencial de radiofreqüència (Ω). A partir de la reorganització de l'equació de q_z obtenim l'equació (4).

$$\frac{m}{z} = \frac{8V}{q_z r_0^2 \Omega^2} \quad (4)$$

Tenint en compte que el valor de q perquè un ió es desestabilitzi de la trampa és de 0.908 i fixant-nos en l'equació (4), podem veure que, per a cada valor de V (al qual va associat un valor concret de Ω), es desestabilitzen els ions que presenten una relació m/z determinada. Així és com opera un analitzador de trampa iònica per separar els diferents ions.

De les solucions de l'equació de Mathieu es pot dibuixar un diagrama d'estabilitat. Els ions presents dins una trampa d'ions són estables en la direcció r i z si els seus paràmetres a_z i q_z es troben sobre l'àrea ratllada (**Figura 3.2**).

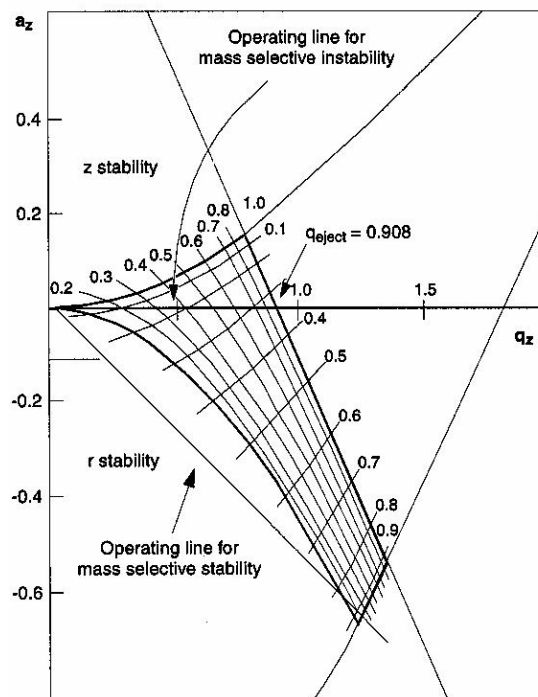


Figura 3.2 Diagrama d'estabilitat d'un ió en una trampa iònica

Per fer un escombrat de masses, l'analitzador opera sobre la línia d'instabilitat ($a_z=0$) augmentant el potencial per així anar augmentant q_z fins arribar al punt d'instabilitat ($q_z=0.908$) en el qual els ions van abandonant la trampa.

Les tres característiques bàsiques que defineixen un analitzador són el límit de massa superior o la m/z més gran que pot mesurar, la transmissió o, el que és el mateix, la relació entre el nombre d'ions que arriben al detector respecte al nombre d'ions formats a la font i la resolució, que és l'habilitat de donar un senyal diferent per dos ions amb una petita diferència de massa.

La **Taula 3.1** resumeix les principals característiques operacionals dels analitzadors de masses més comuns.

| analitzador | energia ions (eV) | límit de massa superior (m/z) | resolució (R per m/z=1000) | rang dinàmic | sensibilitat | cost |
|-------------------|-------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------------|----------------------|
| sectors magnètics | 10^4 | $>10^4$ | elevada ($>10^5$) | $>10^6$ | elevada | alt |
| quadrupol | 10 | $>10^3$ | variable en funció m/z ($>10^3$) | $>10^4$ | n.i. | baix (simple maneig) |
| trampa iònica | $1-10^3$ | $>10^4$ | variable en funció m/z ($>10^4$) | $>10^3$ | elevada (alta transmissió ions) | baix (simple maneig) |
| temps de vol | 10^3 | $>10^5$ | elevada ($>10^3$) | $>10^3$ | elevada (màx. transmissió ions) | n.i. |

n.i.: casos en els que no es disposa d'informació

Taula 3.1 Principals característiques dels analitzadors de masses més comuns [7].

3.1.1.2 GC-MS en mode tàndem (GC-MS/MS)

L'espectrometria de masses en mode tàndem (MS/MS) és un procés que implica almenys dues etapes d'anàlisi de masses. Els experiments MS/MS més comuns utilitzen un

primer analitzador que aïlla el ió precursor, el qual és fragmentat en altres ions que són analitzats en un segon analitzador. És possible augmentar el nombre de cicles mitjançant etapes consecutives d'aïllament i fragmentació fins aconseguir un experiment MS^n (on n representa el nombre de generacions d'ions analitzats). L'exemple plantejat, en el qual s'utilitza més d'un analitzador per a que tingui lloc el procés, és el que es coneix com a espectrometria MS/MS en espai. Existeix una altra variant que és l'espectrometria MS/MS en temps en la que les diferents etapes del procés tenen lloc alternativament en un sol analitzador [6]. Els quatre modes de treball possibles en MS/MS s'esquemmatitzen a la **Figura 3.3**.

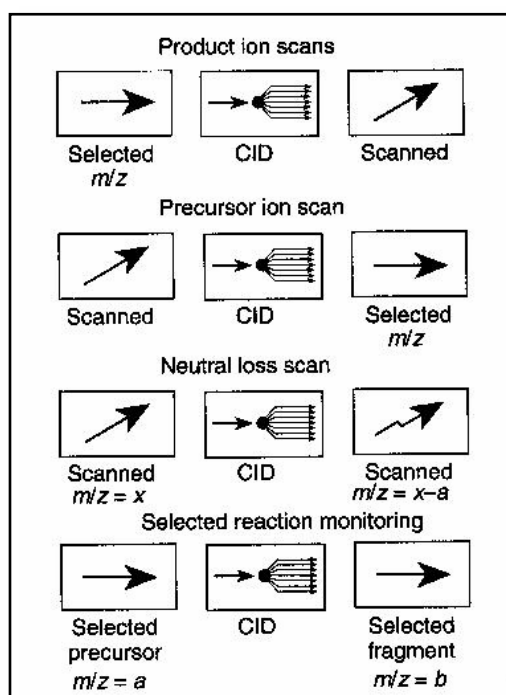


Figura 3.3 Modes de treball en MS/MS

1. Product ion scan (*daughter scan*): consisteix en aïllar un ió precursor d'una determinada m/z i determinar tots els ions fills resultants després de la fragmentació del precursor per col·lisió induïda (*collision-induced decomposition*, CID) o per acció d'un gas inert com xènon. La tècnica CID indueix la descomposició dels ions per mitjà d'un increment en la seva energia interna.

2. Precursor ion scan (*parent scan*): consisteix en escollir un ió producte d'una determinada m/z i fer un escombrat d'ions precursors per tal de trobar aquells que, al fragmentar-se, donin lloc al ió fill escollit.

3. *Neutral loss scan*: consisteix en realitzar escombrats en els dos analitzadors per tal de detectar pèrdues de fragments neutres.

4. *Selected reaction monitoring*: en aquest cas s'escull una m/z determinada en els dos analitzadors. L'objectiu és detectar si s'ha produït un tipus de reacció de fragmentació concret.

S'ha de tenir en compte que els modes de treball 2 i 3 no són possibles en espectrometria MS/MS en temps. La forma més comuna d'operar és *production ion scan*.

Els espectròmetres de masses que operen en tàndem més coneguts són la trampa iònica (MS/MS en temps) i el quadrupol (MS/MS en espai). El primer dels dos analitzadors presenta clars avantatges respecte al segon en termes de cost, mida, pes i requeriments de buit. En aquest instrument, la selecció del ió precursor, la seva fragmentació i l'anàlisi dels ions producte té lloc en un sol espai mentre que per aplicar processos MS/MS en quadrupol es necessita disposar de tres analitzadors en sèrie, el primer on té lloc la selecció del ió pare, el segon que actua com a cel·la de col·lisions i on té lloc la fragmentació i el tercer que és on es produeix l'escombrat d'ions fill.

L'espectrometria de masses en tàndem ha esdevingut un mètode amb molta aplicabilitat per a l'anàlisi de traces en mostres complexes les quals presenten interferències que ens poden dificultar en gran mesura la detecció i quantificació dels anàlits. L'aplicació de mètodes de *clean-up* convencionals dins l'etapa de preparació de mostres disminueix moltes vegades la intensitat del senyal final com a conseqüència de pèrdues dels compostos a analitzar. En aquest sentit, la primera etapa dels processos MS/MS es pot considerar com una etapa de *clean-up* ja que en ella s'eliminen els ions associats a les interferències i resten només aquell ió o ions que provenen dels anàlits d'interès [3]. En l'anàlisi de residus per GC-MS/MS, la relació senyal/soroll (s/n) dels pics dels anàlits augmenta amb el nombre d'etapes MS ($s/n MS^2 < s/n MS^3 < \dots < s/n MS^n$). Així doncs, l'acoblament de la tècnica MS/MS a la cromatografia de gasos és útil per reduir el soroll químic degut a la presència d'interferències de matriu, permet corregir els problemes de coelució d'anàlits amb interferències, fa possible l'elucidació d'estructures complexes i, en definitiva, fa viable la quantificació de compostos orgànics presents en mostres heterogènies amb una sensibilitat molt superior a la que aconseguiríem amb altres mètodes de detecció.

L'acoblament GC-MS/MS s'ha aplicat a l'anàlisi de compostos fenòlics. Per exemple, Saitta et al. [8] l'apliquen a la determinació de compostos de tipus fenòlic en mostres d'oli. Jeannot et al. [9] comparen els límits de detecció obtinguts per a una sèrie de disruptors

endocrins, entre els quals es troben 4-tert-octilfenol, 4-nonilfenol i bisfenol A, utilitzant una tècnica GC-MS amb injecció de grans volums (40 µL) amb els aconseguits amb GC-MS/MS (injecció de 2 µL). Els valors de LODs, tots ells en el rang de les ppt, són menors en aplicar GC-MS/MS (4-tert-butilfenol i 4-nonilfenol, 1 ng·L⁻¹; bisfenol A, 0.5 ng·L⁻¹). Hoai et al. [10] obtenen límits de detecció instrumental de 2 a 11 pg en l'anàlisi dels productes de degradació de nonilfenol polietoxilats mitjançant GC-MS/MS. Hernando et al. [11] desenvolupen dos mètodes d'anàlisi per a un grup de compostos entre els que trobem 4-tert-octilfenol i bisfenol A, un basat en GC-MS prèvia derivatització dels anàlits i un altre basat en GC-MS/MS i sense derivatització. Aquests autors obtenen resultats similars seguint les dues metodologies però conclouen que, per a anàlisis de rutina, l'acoblament GC-MS/MS és l'opció més fàcil i ràpida perquè no requereix d'etapes addicionals com la derivatització que poden conduir a pèrdues dels anàlits. Per altra banda, l'elevada selectivitat i la informació estructural que s'obté de l'espectre de masses dels ions que es formen permet una identificació més vàlida dels compostos a la mostra. No obstant, l'acoblament GC-MS/MS no sempre és possible per limitacions instrumentals dels laboratoris i en aquests casos l'alternativa és l'aplicació d'un mètode GC amb derivatització prèvia dels anàlits per a la detecció de compostos orgànics, tal com veurem en el següent apartat.

3.1.2 Derivatització en cromatografia de gasos

La derivatització en GC és un procés mitjançant el qual es modifica químicament un compost per donar lloc a un derivat amb unes propietats més favorables que el compost de partida per ser analitzat per cromatografia de gasos.

Són moltes les raons per les quals és necessari aplicar mecanismes de derivatització prèviament a l'anàlisi per GC però potser la més habitual és la baixa volatilitat de les substàncies a separar. Aquest cas es veu reflectit sobretot en les substàncies polars que contenen grups de tipus N-H, O-H i S-H. La presència d'aquests grups possibilita l'aparició d'interaccions intermoleculares fortes que poden conduir a la formació d'agregats que difícilment es poden volatilitzar i analitzar per GC. La derivatització d'aquests grups disminueix la polaritat de les substàncies, evita la formació d'agregats i permet dur a terme la seva anàlisi per GC. Amb alguns compostos, com és el cas de les amines de baix pes molecular, la seva excessiva volatilitat pot ser un problema. Per aquestes substàncies, la formació de derivats químics amb un pes molecular major minimitza les pèrdues en la manipulació i ajuda a separar els pics dels anàlits del front de dissolvent en la separació

cromatogràfica [12]. La derivatització també és necessària per a compostos termolàbils que poden patir degradació a les temperatures de treball del cromatògraf de gasos. En aquest cas, el procés ha de donar lloc a derivats més estables i que ofereixin un millor comportament cromatogràfic.

L'anàlisi de substàncies polars per cromatografia de gasos pot produir, a més dels problemes exposats anteriorment, l'aparició de pics asimètrics i amb poca resolució, que són conseqüència de la tendència que tenen aquests compostos a adsorbir-se a les superfícies actives de les parets de la columna i del suport sòlid. Tots aquests efectes es veuen agreujats quan es realitza anàlisi de traces. La derivatització fa possible millorar la detectabilitat de les substàncies polars, evita els efectes de memòria i allarga el temps de vida de les columnes cromatogràfiques. Una altra aplicació de les reaccions de derivatització en cromatografia de gasos es troba en la determinació d'aquells compostos que són similars estructuralment (e.g. isòmers). L'ús d'un agent derivatitzant adient pot conduir a separacions eficaces que no serien possibles sense aquest pas previ.

La necessitat de dur a terme una derivatització dels compostos a analitzar també pot venir condicionada pel tipus de detector a utilitzar. Així, per exemple, la formació de derivats altament halogenats comporta un augment important de sensibilitat en utilitzar un detector de captura d'electrons (ECD). En la detecció per espectrometria de masses, la derivatització permet produir ions més estables que afavoreixen l'obtenció d'informació estructural de les molècules estudiades.

Els agents derivatitzants utilitzats en cromatografia de gasos han de complir una sèrie de requeriments. En primer lloc, la reacció de derivatització no ha de produir subproductes i, si els produeix, aquests han de ser també volàtils, termostables i de baixa polaritat. És recomanable aconseguir un 100% de conversió encara que en molts casos és difícil. La utilització de reactius d'elevada puresa i en excés pot ajudar a aconseguir reaccions quantitatives. D'altra banda, l'excés de reactiu derivatitzant s'ha de poder eliminar fàcilment si la seva presència dificulta la detecció dels derivats. Aquesta necessitat és especialment important en realitzar la detecció per ECD ja que un excés de certs agents derivatitzants poden saturar el sistema de detecció. En espectrometria de masses, l'espectre dels derivats ens ha de proporcionar informació del compost de partida i per a l'anàlisi quantitativa és preferible que els derivats produeixin abundants fragments de massa elevada. La selecció de l'agent derivatitzant apropiat és important ja que aquest pot proporcionar un augment significatiu de

la selectivitat i alhora permet disminuir els límits de detecció en l'anàlisi per espectrometria de masses [4].

La derivatització analítica és efectiva però implica la introducció d'una etapa addicional en el procés analític. A més, es poden formar subproductes que poden interferir en l'anàlisi. Per aquestes raons, la derivatització no es considera moltes vegades com la primera opció per obtenir millors sensibilitats i selectivitats en les determinacions de compostos orgànics. Una manera d'evitar la formació d'interferents és realitzant la derivatització sobre una fase sòlida. D'aquesta manera, la reacció de derivatització té lloc sobre la fase sòlida i els reactius, els productes secundaris i els propis derivats queden retinguts sobre la mateixa. Al final del procés, els derivats han de poder ser eluïts selectivament del medi de reacció [13].

Si ens centrem en la determinació de derivats fenòlics per cromatografia de gasos, ens trobem davant d'un grup de compostos que, per alguns dels motius citats, precisen d'una derivatització prèvia si es vol aconseguir un comportament cromatogràfic adient en la seva detecció i quantificació. A continuació es descriuen els mètodes més aplicats per a la derivatització de compostos fenòlics.

3.1.2.1 Mètodes de derivatització de compostos fenòlics

En la derivatització de compostos fenòlics, els mecanismes més habituals per transformar el grup hidroxil en un grup menys reactiu són l'**alquilació**, l'**acilació** i la **sililació**.

El mètode més habitual és la formació de derivats acilats per reacció dels fenols amb un anhídrid, generalment anhídrid acètic, en presència d'una base. L'acilació converteix els grups hidroxil en grups éster. L'acetilació pot tenir lloc com a últim pas abans de l'anàlisi [14-17], com a pas previ a l'etapa de preconcentració de les mostres per extracció en fase sòlida, per reduir la polaritat dels fenols i aconseguir així també una millora de l'eficàcia del procés SPE [18-20], o conjuntament a etapes d'extracció i preconcentració com la SPME convencional [21,22] o una variant seva en la que la fibra es troba recobrint una barra agitadora que es col·loca a l'interior de la mostra [23] i s'addicionen els reactius de derivatització a la mostra en un principi abans de dur a terme l'extracció. Nakamura et al. [24], fent ús d'aquesta darrera metodologia, comparen les respostes obtingudes per a set alquilfenols i bisfenol A per GC-MS i obtenen, després de la derivatització, sensibilitats fins a 100 vegades superiors a les obtingudes sense derivatització. L'acetilació de fenols no només s'ha aplicat a mostres d'aigua, també s'ha utilitzat en la derivatització d'altres matrius líquides com orina, plasma i saliva [25,26], macerats de suro o mostres de vi [27,28] i

extractes de mostres sòlides com sediments [29]. Ramil et al. [30] utilitzen l'acetilació com a mètode de derivatització de clorofenols en mostres de cendres en una única etapa amb extracció per microones. Altres anhídrids acilants utilitzats per a la derivatització de fenols són anhídrid trifluoroacètic, anhídrid heptafluorobutíric i anhídrid cloroacètic [3]. Altres reactius de derivatització que també es poden utilitzar per a l'acilació de compostos fenòlics són els halurs d'acil, els quals també són efectius per reduir la polaritat de grups amino. Mishra et al. [31] utilitzen el clorur de benzoil per a la derivatització simultània d'amoni, amines alifàtiques i aromàtiques i fenols, prèviament a l'extracció en fase sòlida i anàlisi per GC-MS d'aquests compostos presents en aigües. El clorur de *p*-metoxibenzoil i el clorur o bromur de pentafluorobenzoil també s'han aplicat per a la derivatització de fenols, essent aquest últim un reactiu molt adient quan es vol analitzar els corresponents derivats per ECD degut a l'alt grau d'halogenació que s'obté respecte als productes de partida [12]. Un inconvenient d'aquest mètode és la formació de subproductes àcids que s'han d'eliminar del medi de reacció abans de dur a terme la separació cromatogràfica. La formació de derivats acilats és complexa ja que els reactius acilants acostumen a ser perillosos, al ser sensibles a la humitat. No obstant, els derivats acil, un cop formats, són estables a la hidròlisi.

Una altra forma de derivatitzar els compostos fenòlics és aplicant mètodes d'alquilació. En aquest cas té lloc la transformació del grup hidroxil per un grup èter per substitució de l'hidrogen fenòlic per un grup alquil. El reactiu alquilant més conegut és el diazometà (CH_2N_2) però té el gran inconvenient que és un compost reconegut com a carcinogènic i, per aquesta raó, es tendeix a substituir-lo per altres agents. No obstant, Thomsen et al. [32-35] han publicat recentment treballs en els que el diazometà s'utilitza com a reactiu derivatitzant per a l'anàlisi, en mostres de plasma, sèrum i llet humana, de compostos bromats retardants de flama entre els quals trobem tetrabromobisfenol A, tetraclorobisfenol A, 2,4,6-tribromofenol i pentabromofenol. El diazometà es sintetitza normalment just abans de la derivatització per descomposició de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida o *N*-metil-*N*-nitrosamina catalitzada per una base i s'addiciona a la mostra en fase gas. L'excés de diazometà es pot reconèixer fàcilment pel seu color groc i es pot destruir per addició d'àcid acètic, que condueix a la formació d'acetat de metil i nitrogen gas, productes menys perjudicials. Altres reactius alquilants utilitzats per a la derivatització de compostos fenòlics en aigües són el clorur i el bromur de pentafluorobenzil [36,37]. Hanada et al. [38] han introduït també aquesta metodologia de derivatització a l'anàlisi de mostres d'aire i sediments. Aquest tipus de derivatització acostuma a requerir elevades temperatures i temps de reacció entre 30 minuts i

5 hores, encara que no sempre és necessari. Kuklenyik et al. [39] utilitzen el bromur de pentafluorobenzil per a la derivatització d'alquilfenols i bisfenol A en mostres d'orina mitjançant una metodologia que realitza extracció en fase sòlida i derivatització en un sol pas. Aquest mètode consisteix en carregar l'agent derivatitzant en un cartutx d'extracció (Bond Elute PPL, amb matriu de poliestirè-divinilbenzè) prèviament al pas de la mostra que conté els anàlits, de manera que la derivatització té lloc a la pròpia fase sòlida. Un altre grup d'agents alquilants de compostos fenòlics són els iodurs d'alquil, essent el més habitual el iodur de metil, els quals s'apliquen en condicions alcalines [12]. Alguns dels principals avantatges d'aquestes metodologies de derivatització són el gran nombre d'agents disponibles i que l'alquilació proporciona, en general, derivats estables. Per contra, els inconvenients són que els reactius utilitzats són sovint tòxics i les condicions de reacció acostumen a ser molt agressives.

La sililació constitueix el tercer tipus de derivatització de compostos amb grups polars reactius, el qual ha estat àmpliament utilitzat per a compostos fenòlics. La substitució d'hidrogens actius de grups OH (e.g., alcohols, fenols, àcids carboxílics, oximes), NH (e.g., amines, amides i imines) i SH (e.g., tiols i àcids tiocarboxílics) per un grup silil és el mètode més simple, ràpid i versàtil per a la derivatització d'aquests compostos prèvia a l'anàlisi per GC i GC-MS [40]. El mecanisme del procés de derivatització consisteix en un atac nucleofílic de tipus SN_2 des de l'hidrogen fenòlic cap a l'àtom de Si de l'agent derivatitzant, tal com s'esquematitza a la **Figura 3.4**.

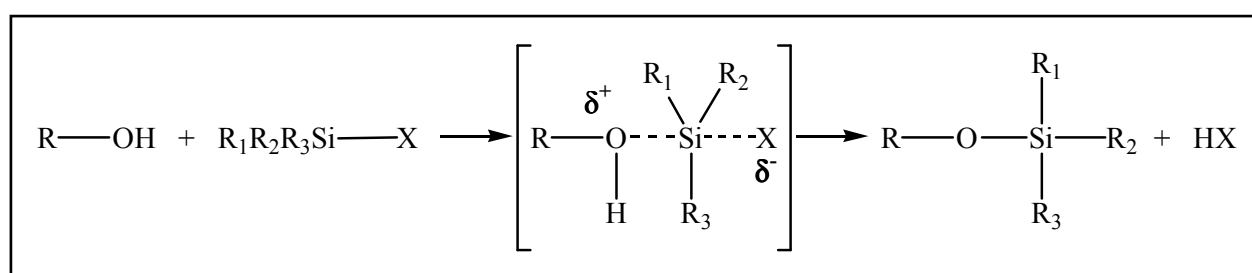


Figura 3.4 Mecanisme implicat en les reaccions de sililació de compostos fenòlics. [12]

Perquè la reacció tingui lloc fàcilment X ha de ser un bon grup sortint, això significa, amb baixa basicitat i habilitat per estabilitzar càrrega negativa a l'estat de transició. Alguns dels reactius sililants més utilitzats per a la derivatització de compostos fenòlics són N-metil-

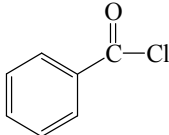
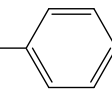
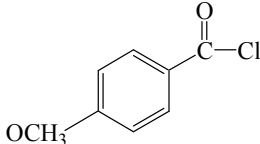
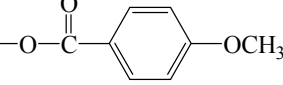
N-tertbutildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) [41-43], N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) [44-48], trimetilclorsilà (TMCS) ja sigui sol [49] o juntament amb un altre agent, hexametildisilazà (HMDS) formant una mescla TMCS:HMDS:piridina (1:3:9) coneguda com a reactiu SIL-A [50], N,O-bis(trimetilsilil) acetamida (BSA) [51,10] o N-trimetilsililimidazola (TMSI) [49]. Els agents sililants acostumen a ser sensibles a la humitat pel que és necessari que el medi de reacció estigui lliure de traces aquoses. Si el medi conté altres substàncies amb àtoms d'hidrogen actius, com solvents pròtics o fins i tot aigua, hem d'assegurar un excés de derivatitzant ja que aquestes substàncies també seran transformades. Els derivats formats també són sensibles. Un avantatge de derivatitzar amb MTBSTFA respecte a altres agents és que els derivats formats en aquest cas són més estables a la humitat per l'existència del grup tertbutil. Per efectes estèrics, la presència d'aquest grup voluminós fa que l'enllaç Si-O quedi protegit de l'atac hidrolític de molècules d'aigua. Un altre factor a tenir en compte és que, en utilitzar BSTFA és aconsellable l'addició d'un estimulador, generalment TMCS, que serveix per augmentar l'eficiència de la derivatització sobretot per anàlits que contenen més d'un grup hidroxil. Zafra et al. [49] comparen l'eficiència de 5 agents derivatitzants diferents (TMSA, TMSI, BSTFA, TMCS i SIL-A) en l'anàlisi de bisfenol A i els seus derivats clorats per GC-MS i troben que, per aquests compostos, l'agent més adient és BSTFA ja que amb ell s'obtenen senyals més sensibles, sobretot per als compostos més clorats.

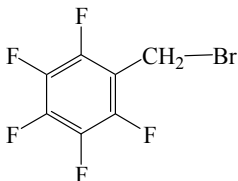
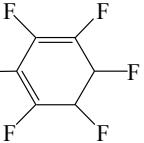
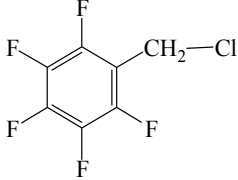
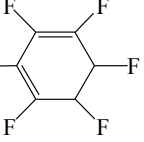
Un altre grup d'agents derivatitzants de compostos fenòlics són aquells que resulten en la formació de derivats de l'àcid carbònic. Es tracta de cloroformiats d'alquil com isobutilcloroformiat [43,52], butil o hexilcloroformiat [53] o etilcloroformiat [26].

Altres derivatitzacions són les que proposen Kojima et al. [54] els quals utilitzen pentafluoropiridina per a la derivatització de catorze compostos fenòlics presents en mostres aquoses sobre matriu sòlida (intercanviador aniònic) simultàniament a un procés d'extracció en fase sòlida. Rolfes et al. [55] utilitzen la derivatització de fenols amb clorur d'acetilferrocè per donar lloc als corresponents ésters.

Tal com ja s'ha comentat en parlar de l'acetilació de fenols, molts dels mètodes de derivatització descrits en aquest apartat s'han aplicat també conjuntament amb tècniques de preconcentració i *clean-up* com la SPE o la SPME. Concretament, la derivatització duta a terme sobre un sorbent d'extracció en fase sòlida (derivatització analítica en fase sòlida, SPAD), ha estat àmpliament estudiada per diferents tipus d'anàlits, reactius derivatitzants i fases sòlides [13].

La **Taula 3.2** resumeix els mètodes de derivatització de compostos fenòlics més comuns descrits en aquest apartat.

| agent derivatitzant | estructura | derivat | A C I L L A C I Ó |
|---------------------------|--|---|---|
| anhídrid acètic | $\text{H}_3\text{C-CO-O-CO-CH}_3$ | anell-O-CO-CH ₃ | |
| anhídrid trifluoroacètic | $\text{F}_3\text{C-CO-O-CO-CF}_3$ | anell-O-CO-CF ₃ | |
| anhídrid cloroacètic | $\text{ClH}_2\text{C-CO-O-CO-CH}_2\text{Cl}$ | anell-O-CO-CH ₂ Cl | |
| clorur de benzoil |  | anell-O-C(=O)-  | |
| clorur de p-metoxibenzoil |  | anell-O-C(=O)-  | |

| agent derivatitzant | estructura | derivat | A L Q U I L L A C I Ó |
|-----------------------------|---|---|---|
| diazometà | CH_2N_2 | anell-O-CH ₃ | |
| bromur de pentafluorobenzil |  | anell-O-CH ₂ -  | |
| clorur de pentafluorobenzil |  | anell-O-CH ₂ -  | |

| agent derivatitzant | estructura | derivat |
|---------------------|--|---|
| MTBSTFA | $ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CF}_3-\text{C}-\text{N}-\text{Si}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{anell}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $ |
| BSTFA | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CF}_3-\text{C}=\text{N}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{anell}-\text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ |
| TMCS | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{anell}-\text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ |
| BSA | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{N}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{anell}-\text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ |
| TMSI | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{N} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \quad \text{N} \quad \text{N} \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{anell}-\text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $ |

S
I
L
L
A
C
I
Ó

Taula 3.2 Estructures dels agents derivatitzants utilitzats en la derivatització de compostos fenòlics per a GC (anell: representa l'estructura de l'anell de fenol amb els seus corresponents substituents).

3.1.3 Compostos fenòlics estudiats

En aquest capítol es desenvolupa un mètode SPE per a l'extracció i preconcentració de 10 compostos bromofenòlics i bisfenòlics de tipus A en aigües i s'ha aplicat a la determinació d'aquestes substàncies en mostres aquoses procedents d'una estació depuradora d'aigües residuals. Algunes de les propietats fisicoquímiques més importants d'aquests compostos es resumeixen a la **Taula 3.3**.

| compost | nom abreviat | pes molecular (g/mol) | T _{ebull.} (°C) (a 760Torr) | log K _{ow} | pKa | P _{vapor} (Torr) (a 25°C) |
|----------------------|--------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------|------|------------------------------------|
| 2-bromofenol | 2BP | 173.01 | 194.5 | 2.470 | 8.43 | 0.315 |
| 2,4-dibromofenol | 24DBP | 251.90 | 238.5 | 3.431 | 7.86 | 0.0274 |
| 2,6-dibromofenol | 26DBP | 251.90 | 256.6 | 3.412 | 6.89 | 9.49·10 ⁻³ |
| 2,4,6-tribromofenol | 246TBP | 330.80 | 286.8 | 4.326 | 6.34 | 1.50·10 ⁻³ |
| 4-bromo-3-metilfenol | 4B3MP | 187.03 | 247.4 | 2.950 | 9.50 | 0.0163 |
| 2-bromo-4-metilfenol | 2B4MP | 187.03 | 213.5 | 2.930 | 8.73 | 0.112 |
| pentabromofenol | PBP | 488.59 | 352.3 | 6.097 | 4.43 | 1.91·10 ⁻⁵ |
| bisfenol A | BPA | 228.29 | 400.8 | 3.431 | 9.73 | 5.34·10 ⁻⁷ |
| tetrabromobisfenol A | TBBPA | 543.87 | 417.9 | 7.291 | 6.33 | 1.41·10 ⁻⁷ |
| tetraclorobisfenol A | TCBPA | 366.07 | 401.9 | 5.681 | 6.42 | 4.93·10 ⁻⁷ |

Taula 3.3 Propietats fisicoquímiques dels compostos estudiats.

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 Reactius

- 2-bromofenol: sòlid, 98%, ref. 10091-5, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- 2,4-dibromofenol: sòlid, 95%, ref. 25816-4, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- 2,6-dibromofenol: sòlid, 97%, ref. 34269, Fluka (Steinheim, Alemanya).
- 2,4,6-tribromofenol: sòlid, 99%, ref. 13771-5, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- 4-bromo-3-metilfenol: sòlid, 99%, ref. 44088-4, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- 2-bromo-4-metilfenol: sòlid, 96%, ref. b7280-9, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Pentabromofenol: sòlid, 96%, ref. p160-8, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Bisfenol A: sòlid, 97%, ref. 22135000, Acros Organics (Geel, Bèlgica)
- Tetraclorobisfenol A: sòlid, 98%, ref. 19244-9, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Tetrabromobisfenol A: sòlid, 97%, ref. 33039-6, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- PCB-30: sòlid, 98.5%, ref. 20003000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- Acetat d'etil ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$): líquid, reactiu SuprSolv, ref. 110972.2500, Merck (Barcelona, Espanya).
- Metanol (CH_3OH): líquid, reactiu LIChrosolv, ref. 106007.2500, Merck (Barcelona, Espanya).
- Acetona (CH_3COCH_3): líquid, reactiu SupraSolv, ref. 100012.2500, Merck (Barcelona, Espanya).
- Hexà (C_6H_6): líquid, reactiu SupraSolv, ref. 104371.2500, Merck (Barcelona, Espanya).
- N-metil-N-terbutildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA): líquid, 99%, ref. 394882-10X1, Supelco (Bellefonte, PA, Estats Units).
- N-metil-N-dimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA): líquid, 99%, ref. 394866-10X1, Supelco (Bellefonte, PA, Estats Units).
- N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA): líquid, 99%, ref. 33024, Supelco (Bellefonte, PA, Estats Units).
- Àcid clorhídric (HCl): líquid, 36%, ref. 20252.324, Prolabo NormaPur (París, França).
- Hidrogencarbonat de potassi (KHCO_3): sòlid, 99.7%, ref. 23720-5, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Anhídrid acètic ($\text{CH}_3\text{COOCOCH}_3$): líquid, 98%, ref. 822278, Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Alemanya).

- Sulfat sòdic anhidre (Na_2SO_4): sòlid, 99%, ref. 131716.1211, Panreac Química (Barcelona, Espanya).
- Heli (He): gas, 99.999%, ref. 155, Carburos Metàlics (Barcelona, Espanya).
- Nitrogen (N_2): gas, 99.999%, ref. 231, Carburos Metàlics (Barcelona, Espanya).

Es preparen dissolucions estoc de concentració aproximada $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cadascun dels compostos fenòlics individuals en metanol i acetat d'etil. A partir dels estocs en metanol es preparen, en acetona, solucions de diferents concentracions que contenen els deu compostos i que ens serviran com a solucions de fortificació de les aigües MilliQ i residuals. Per altra banda, a partir dels estocs individuals en acetat d'etil es preparen solucions intermèdies que contenen els 10 anàlits també en acetat d'etil, que utilitzarem com a solucions mare per a la preparació dels patrons de calibratge.

3.2.2 Aparells i materials

- Sistema GC-MS Saturn 2100 de Varian (Madrid, Espanya) equipat amb un cromatògraf de gasos gc3900 i un espectròmetre de masses (trampa d'ions) ms2100T. Per dur a terme la separació dels anàlits s'utilitza una columna cromatogràfica VF 5MS (Varian) de 30 metres de longitud, 0.25 mm i.d. i 0.25 μm de gruix de film de fase estacionària .
- Balança analítica bp3105, Sartorius Analytic (Göttingen, Alemanya).
- Sistema de buit aspirator A-35, Eyela (Tòquio, Japó).
- Sistema de concentració Turbo-vap II, Zymark (Hopkinton, MA, Estats Units).
- Micropipetes transferpette, Brandtech Scientific, INC (Essex, Regne Unit).
- Sistema MilliQ gradient A-10mzmqssv0t4.
- pH-metre Methrom 654, Methrom (Herisau, Suïssa).
- Filtre de llana de vidre AP4004705 de Millipore (Billerica, MA, Estats Units).
- Cartutx OASIS HLB de 60 mg de fase estacionària, ref. WAT094226 de Waters (Milford, MA, Estats Units).
- Adaptador per a cartutx PTFE Isolute (1, 3, 6 mL) ref. 120-1100, International Sorbent Technology LTD (Hengood, Regne Unit).

3.2.3 Procediment experimental

3.2.3.1 Anàlisi de compostos fenòlics

Els compostos fenòlics estudiats s'han analitzat mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses. S'han assajat diferents condicions d'anàlisi per tal d'aconseguir separar els 10 compostos estudiats en les millors condicions de temps i comportament cromatogràfic. Les condicions més favorables trobades pel que fa al gradient de temperatura són les següents: temperatura inicial de 50°C que es manté durant 2 minuts, increment fins a 200°C a una velocitat de 8°C/min i fins a 300°C a 20°C/min i es manté la temperatura de 300°C durant 15 minuts. S'utilitza heli com a gas portador a un flux d'1 mL·min⁻¹. L'injector opera en mode *splitless* (1 min) i es manté a 300°C. Es treballa amb un pols de pressió de 20 psi durant 1.1 minuts. En aquestes condicions s'aconsegueixen separar tots els anàlits en un temps inferior a 30 minuts. La temperatura de la interfase es manté a 300°C i l'espectròmetre de masses opera amb impacte electrònic (70eV).

3.2.3.2 Preconcentració per extracció en fase sòlida

El sorbent utilitzat per retenir els compostos fenòlics presents en les mostres aquoses és una fase polimèrica comercial amb matriu de divinilbenzè i N-vinilpirrolidona (Oasis HLB). El procediment experimental inclou fonamentalment quatre etapes que ja s'han descrit en el **capítol 2**. El condicionament de la fase sòlida es realitza amb 3 mL d'acetat d'etil, 3 mL d'acetona i 3 mL d'aigua bidestil·lada ajustada a pH=2. La càrrega de la mostra (pH=2) amb els anàlits té lloc amb l'ajuda d'un sistema de buit a un flux aproximat de 30 mL·min⁻¹. Un cop retinguts els anàlits, es renta la fase amb 3 mL d'aigua bidestil·lada igual que la utilitzada en el condicionament i s'asseca sota pressió de N₂ (8-12 psi) durant 45 minuts. Els anàlits adsorbits a la fase sòlida s'elueixen amb 3 mL d'acetat d'etil, volum que es concentra fins a uns 0.5 mL i es torna a arrasar a 1 mL amb acetat d'etil. L'extracte final s'asseca amb sulfat sòdic anhidre abans de dur a terme l'etapa de derivatització dels compostos fenòlics. Quan s'analitzen aigües residuals, aquestes es filtren a través d'una membrana de llana de vidre posteriorment a la seva acidificació amb HCl i abans de dur a terme el procés d'extracció en fase sòlida.

3.2.3.3 Derivatització de compostos fenòlics

S'han assajat tres reactius diferents (MSTFA, BSTFA i MTBSTFA) per a la sililació de compostos fenòlics prèvia a la seva anàlisi per GC-MS i GC-MS/MS. A un volum determinat d'extracte SPE o patró de calibratge (diferent en funció del cas) s'afegeix el derivatitzant, el patró intern (PCB-30) i el volum necessari d'acetat d'etil fins a arribar al volum final desitjat. La mescla s'agita perquè tingui lloc la derivatització. El temps, la temperatura i el volum de derivatitzant són paràmetres que s'han optimitzat i els resultats obtinguts en cada una de les proves es discutiran a l'apartat de resultats i discussió.

3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest capítol es desenvolupa un mètode de determinació de 7 compostos fenòlics bromo-substituïts i 3 compostos bisfenòlics de tipus A en mostres d'aigua residual. La metodologia utilitzada parteix de l'extracció en fase sòlida dels anàlits i posterior detecció per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses. Per millorar les condicions de detectabilitat dels fenols, s'aplica una etapa de derivatització prèvia a l'anàlisi per GC-MS.

3.3.1 Caracterització del mètode cromatogràfic

El desenvolupament d'un mètode GC-MS inclou fonamentalment dues etapes; en primer lloc l'optimització de les característiques cromatogràfiques més adients per aconseguir una bona separació dels anàlits en el mínim de temps i, en segon lloc, l'establiment dels paràmetres espectromètrics que ens condueixin a la detecció correcta, amb sensibilitat i grau de resolució elevats.

Pel que fa a la primera etapa, després de realitzar diverses proves, la separació òptima dels deu compostos fenòlics estudiats s'aconsegueix amb les condicions cromatogràfiques següents: es comença amb una temperatura de 50°C que es manté durant 2 minuts, s'incrementa la temperatura fins a 200°C amb una rampa de 8°C/min i seguidament una segona rampa de 20°C/min fins a assolir la temperatura final de 300°C, la qual es manté durant 15 minuts. La injecció té lloc en mode *splitless* a 300°C amb un pols de pressió de 20 psi durant 1.1 minuts per tal d'aconseguir augmentar el flux de gas portador a través del *liner* i una transferència més ràpida dels anàlits cap a la columna. Aquest augment de la velocitat de transferència es tradueix en pics més estrets i amb relacions senyal/soroll més elevades. Es treballa amb un flux de gas portador heli d'1 mL·min⁻¹ i injecció d'1 µL. En aquestes condicions el temps total per a cada anàlisi és de 41 minuts tot i que el compost que presenta un temps de retenció més gran, tetrabromobisfenol A, apareix abans de 30 minuts. Mantenir la temperatura final durant més temps ens permet evitar que possibles interferències de les mostres d'aigua residual quedin retingudes a la columna i ens provoquin problemes de coelució en injeccions posteriors.

La temperatura de la línia de transferència dels anàlits cap a l'espectròmetre de masses es manté a 300°C igual que la temperatura final del forn per tal que no es produeixin pèrdues dels compostos per condensació. El detector MS utilitza un analitzador de trampa d'ions que treballa a 200°C amb una font d'ionització interna. Tot i que l'instrument pot operar en

impacte electrònic i ionització química, s'ha escollit treballar en mode EI amb una energia d'ionització de 70 eV. L'adquisició de dades es divideix en tres segments i les característiques associades a cadascun d'ells es resumeixen a la **Taula 3.4**.

| segment | interval t. (min) | interval m/z | corrent d'emissió (mA) | t. per scan (s) |
|---------|-------------------|---------------|------------------------|-----------------|
| 1 | 0-10 | no adquisició | 10 | 1 |
| 2 | 10-22 | 70-400 | 20 | 0.8 |
| 3 | 22-35 | 300-650 | 20 | 0.6 |

Taula 3.4 Condicions emprades per a l'adquisició de dades en MS.

Durant els primers deu minuts no es produeix adquisició ja que els temps de retenció dels compostos més volàtils són superiors a aquest valor i d'aquesta manera evitem enregistrar el senyal degut al dissolvent.

La presència d'àtoms de Br als fenols estudiats fa que els espectres de masses obtinguts per a aquests compostos mostrin un patró característic. El brom presenta dos isòtops, ^{79}Br i ^{81}Br , amb abundàncies naturals de 50.69% i 49.31% respectivament, per la qual cosa l'existència d'un àtom de brom dóna lloc a dos senyals pràcticament de la mateixa intensitat. Igualment, la presència de dos àtoms de Br es tradueix en tres senyals d'intensitat relativa 1:2:1, la presència de tres àtoms de Br, en quatre senyals d'intensitat relativa 1:3:3:1, etc. A la **Figura 3.5** es pot veure l'espectre de masses corresponent al 2,4,6-tribromofenol. En ell, el pic de l'ió molecular presenta el patró característic d'una molècula amb tres àtoms de brom.

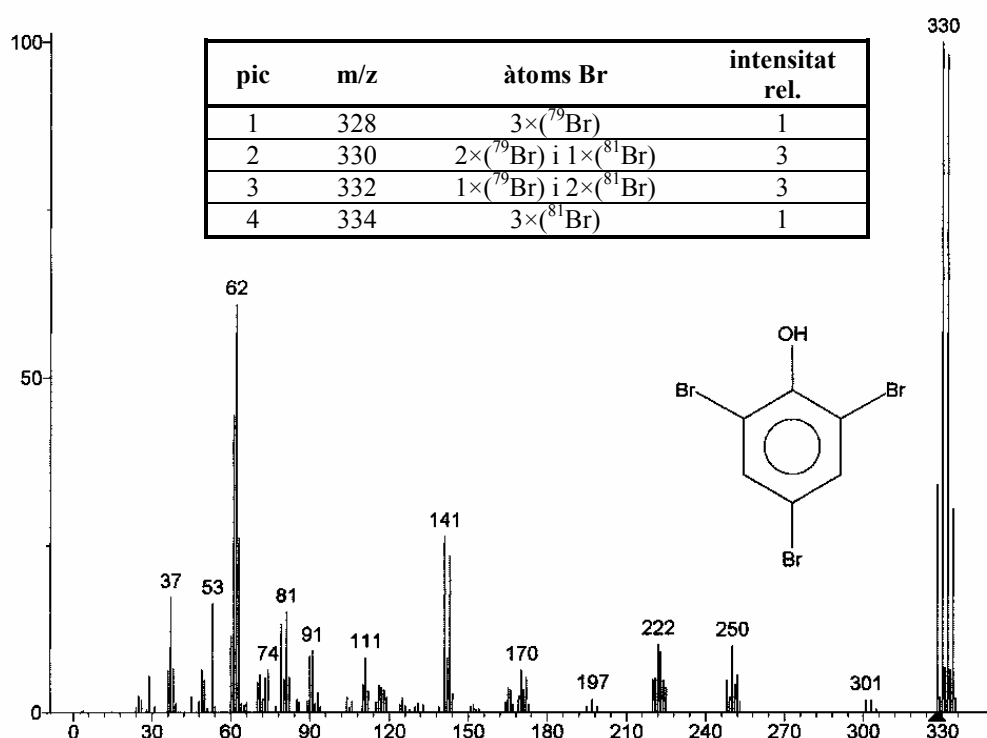


Figura 3.5 Espectre de masses de 2,4,6-tribromofenol

A la vegada també podem observar el patró degut a la presència de Br en algun dels senyals dels fragments. Per exemple, el senyal marcat amb $m/z = 250$ correspon a la pèrdua d'un àtom de Br i té un patró que coincideix amb el que esperariem per a una molècula amb dos àtoms de brom.

En les condicions GC i MS exposades, el pic cromatogràfic corresponent al compost 2,4,6-tribromofenol, buscat pels seus ions característics 330+332, és el que podem veure a la **Figura 3.6(a)**.

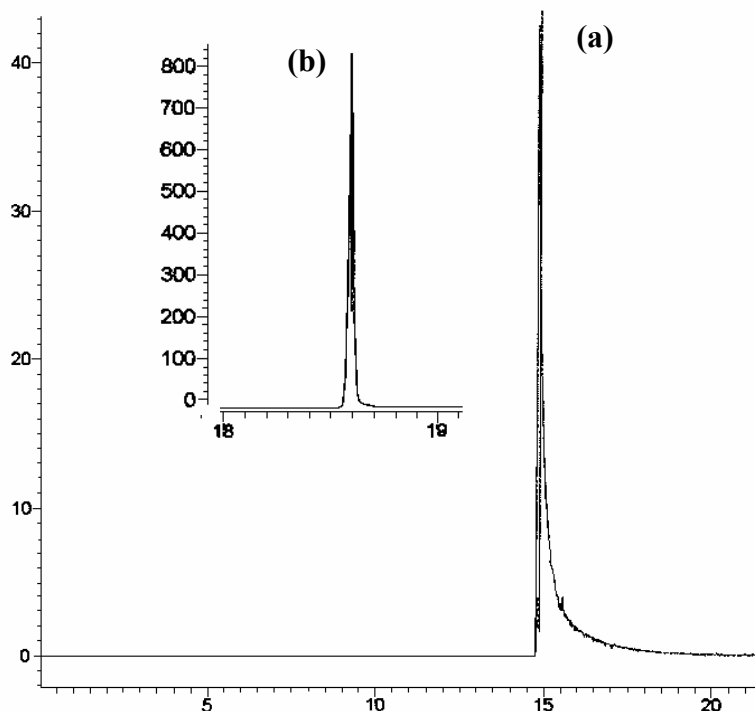


Figura 3.6 Pic corresponent al 2,4,6-tribromofenol en les condicions cromatogràfiques optimitzades a) sense derivatització i b) prèvia derivatització amb 20 μL de MSTFA. Detecció dels derivats per GC-MS.

La forma del pic obtingut no és gaussiana tal com esperariem sinó que aquest presenta molta cua i aquest comportament es repeteix en els pics de tots els altres compostos. Els compostos fenòlics s'inclouen dins el grup de substàncies polars, que, sense derivatització prèvia, poden donar lloc a pics asimètrics i amb poca resolució. Tal com ja s'ha comentat a l'apartat 3.1.2, aquest comportament és degut a la tendència que tenen aquests compostos a adsorbir-se sobre les superfícies actives de la columna cromatogràfica deguda principalment a la presència de grups hidroxil. A la **Figura 3.6(b)** es pot veure també el pic corresponent al mateix compost, però ara derivatitzat amb 20 μL de MSTFA. En aquest cas, el pic obtingut és gausià, molt més estret i té una relació senyal/soroll (s/n) molt superior per a la mateixa concentració que el pic del compost no derivatitzat. Això ens fa suposar que la sensibilitat

dels derivats serà molt superior a la dels compostos de partida i que podem assolir, a la vegada, límits de detecció més baixos. Aquest mateix comportament també s'observa en utilitzar la cromatografia de gasos acoblada a un detector d'emissió atòmica (GC-AED) demostrant que els problemes cromatogràfics dels compostos polars són independents del tipus de detecció emprada.

A la vista d'aquests resultats, és evident que, a l'hora d'analitzar els fenols objecte d'estudi, ens serà imprescindible aplicar una etapa de derivatització prèvia a la seva determinació per poder aconseguir un comportament cromatogràfic òptim per a tots aquests compostos. Aquesta etapa de derivatització s'estudiarà més endavant.

3.3.1.1 Condicions de treball en MS/MS

En aquest capítol també s'ha desenvolupat un mètode d'espectrometria de masses en tàndem (MS^2) per a l'anàlisi dels deu compostos fenòlics objecte d'estudi. Aquesta metodologia ens permetrà assolir límits de detecció més baixos per a aquestes substàncies i, a la vegada, reduir el senyal químic provocat per interferències presents a les mostres. Consisteix en escollir, per a cada compost, un ió pare que presenti una intensitat suficient en el seu espectre de masses i optimitzar les condicions de fragmentació d'aquest precursor per tal d'obtenir un espectre de masses dels fragments que encara contingui una certa intensitat del ió pare i un ió fill majoritari que és el que ens servirà per quantificar. El mode de treball que utilitzem és el *product ion scan* (veure apartat 3.1.1.2). L'optimització de l'energia per a fragmentar cadascun dels ions pare es realitza a través d'una opció del propi software (*automated method development*, AMD) i totes aquestes proves s'han dut a terme a partir d'una mescla dels deu compostos de concentració aproximada $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El derivatitzant utilitzat per a la sililació és N-metil-trimetilsililtri-fluoroacetamida (MSTFA) que, tal com veurem més endavant, serà l'escollit per treballar al ser el que proporciona unes millors propietats. La **Taula 3.5** i **Taula 3.6** resumeixen les condicions MS i MS/MS específiques per a cada compost.

| compost | t. retenció (min) | ions quant. MS (m/z) |
|---------------|-------------------|----------------------|
| 2BP | 12.4 | 229+231 |
| 2B4MP | 14.1 | 243+245 |
| 4B3MP | 14.4 | 243+245 |
| 26DBP | 16.3 | 309+311 |
| 24DBP | 16.5 | 309+311 |
| 246TBP | 19.6 | 387+389 |
| BPA | 23.4 | 357:358 |
| PBP | 24.9 | 545+547 |
| TCBPA | 25.9 | 493:497 |
| TBBPA | 27.7 | 362:368 |

Taula 3.5 Condicions de quantificació de compostos fenòlics en el mètode GC-MS.

| compost | rang m/z | ió pare (m/z) | ió fill majoritari (m/z) | ió quant. MS/MS (m/z) | <i>excitation storage level</i> (m/z) | amplitud excitació (V) | LOQ estimat ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|---------------|----------|---------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------------------|------------------------|---|
| 2BP | 110-250 | 231 | 149 | 149 | 100 | 0.96 | 0.5 |
| 2B4MP | 110-260 | 245 | 163 | 163 | 100 | 0.9 | --- |
| 4B3MP | 110-260 | 245 | 163 | 163 | 100 | 0.9 | --- |
| 26DBP | 130-320 | 309 | 228 | 228 | 120 | 0.95 | 0.5 |
| 24DBP | 130-320 | 309 | 228 | 228 | 120 | 0.95 | 1 |
| 246TBP | 160-400 | 387 | 308 | 387 | 150 | 1 | 1 |
| BPA | 130-400 | 357 | 191 | 191 | 120 | 0.78 | 0.2 |
| PBP | 210-580 | 547 | 466 | 466 | 200 | 0.97 | 30 |
| TCBPA | 210-530 | 496 | 261 | 494 | 200 | 0.97 | 2 |
| TBBPA | 250-620 | 594:596 | 435 | 593 | 240 | 0.95 | 30 |

Taula 3.6 Condicions de quantificació de compostos fenòlics en el mètode GC-MS/MS.

En el mètode MS/MS s'utilitza una finestra d'aïllament de 3 m/z i un corrent d'emissió de 80 μA . En alguns casos, el ió de quantificació per a MS/MS no es correspon amb el ió fill majoritari. Aquest fet s'observa per als compostos per als quals el ió pare pateix poca fragmentació i la intensitat del ió fill majoritari no és suficient per aconseguir una correcta

quantificació. Els límits de quantificació que apareixen a l'última columna de la **Taula 3.6** són orientadors. S'han calculat analitzant un patró de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ excepte per a PBP i TBBPA, per als quals se n'ha utilitzat un de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Assumint com a límit de quantificació aquell pic que presenta una relació senyal/soroll (s/n) de 10 i fixant-nos en els valors de s/n dels pics de cada compost a les concentracions anteriors, es poden calcular quines concentracions ens proporcionaran una $s/n=10$ per a cada compost, és a dir, el seu límit de quantificació. Per exemple, el pic de 2BP a $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ té una relació s/n de 484. Si dividim aquest valor per 10 ens dóna un valor de 48.4, el qual ens indica que podem reduir la concentració de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ unes 48.4 vegades. Per tant, dividim $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ entre 48.4 i obtenim 0.41 que, arrodonint, ens proporciona un límit de quantificació orientatiu de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La **Figura 3.7** mostra el cromatograma obtingut en les condicions optimitzades per a una mescla que conté els deu compostos fenòlics estudiats a concentracions que es troben dins el rang $1\text{-}2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

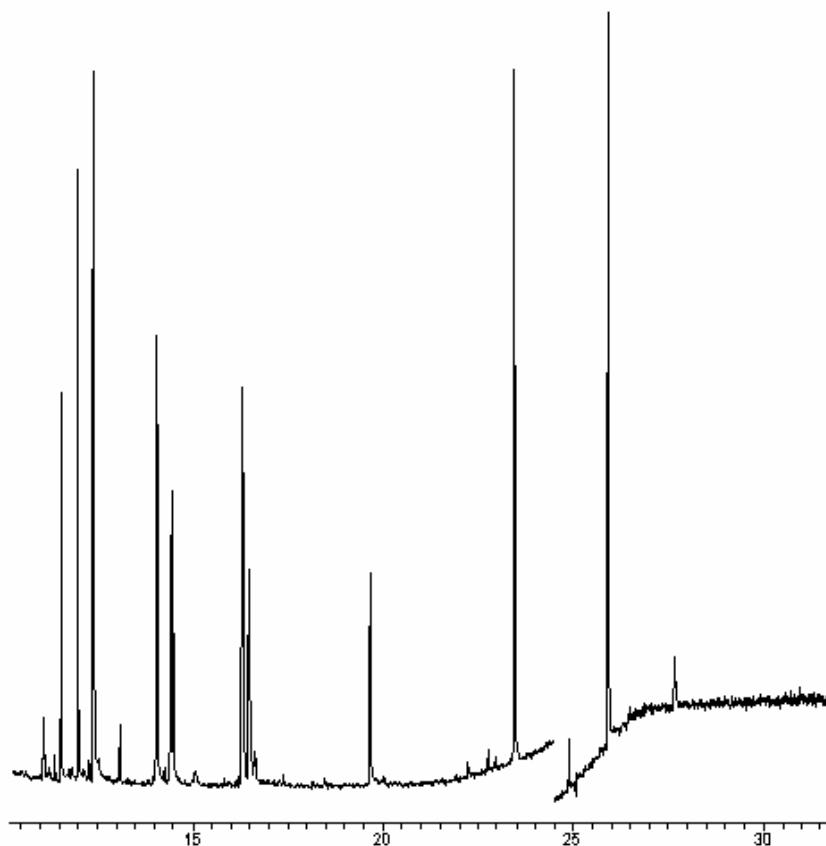


Figura 3.7 Cromatograma obtingut en GC-MS per a una mescla dels deu compostos estudiats

S'ha estudiat la linealitat d'ambdós mètodes (MS i MS/MS) i els resultats obtinguts es recullen a la **Taula 3.7**.

| MÈTODE GC-MS | | | | |
|---------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------|
| compost | interval conc. (ppm) | pendent ($\cdot 10^{-5}$) | ordenada origen ($\cdot 10^{-3}$) | r^2 |
| 2BP | 0.027-1.343 | 2.32 ± 0.01 | -1.1 ± 0.7 | 0.99990 |
| 2B4MP | 0.01-0.49 | 3.94 ± 0.06 | 153.9 ± 1.3 | 0.99912 |
| 4B3MP | 0.018-0.912 | 0.84 ± 0.02 | 0.3 ± 0.9 | 0.99770 |
| 26DBP | 0.013-0.637 | 2.75 ± 0.02 | 1.0 ± 0.5 | 0.99983 |
| 24DBP | 0.013-0.657 | 1.85 ± 0.01 | -0.2 ± 0.3 | 0.99988 |
| 246TBP | 0.013-0.637 | 1.67 ± 0.02 | -1.1 ± 0.5 | 0.99954 |
| BPA | 0.009-0.235 | 3.55 ± 0.08 | 1.6 ± 0.9 | 0.99843 |
| PBP | 0.094-0.471 | 0.34 ± 0.02 | -2.1 ± 0.8 | 0.99489 |
| TCBPA | 0.011-0.559 | 2.30 ± 0.09 | -7.3 ± 2.5 | 0.99334 |
| TBBPA | 0.106-0.529 | 0.23 ± 0.02 | -0.9 ± 0.8 | 0.98980 |

| MÈTODE GC-MS/MS | | | | |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------|
| compost | interval conc. (ppm) | pendent ($\cdot 10^{-5}$) | ordenada origen ($\cdot 10^{-4}$) | r^2 |
| 2BP | 0.027-1.343 | 5.0 ± 0.2 | -1.4 ± 1.0 | 0.99599 |
| 2B4MP | 0.01-0.49 | 13.9 ± 0.4 | 45.4 ± 0.8 | 0.99718 |
| 4B3MP | 0.018-0.912 | 2.64 ± 0.02 | -0.17 ± 0.07 | 0.99980 |
| 26DBP | 0.013-0.637 | 5.41 ± 0.03 | -0.2 ± 0.1 | 0.99985 |
| 24DBP | 0.013-0.657 | 3.82 ± 0.04 | -0.4 ± 0.1 | 0.99965 |
| 246TBP | 0.013-0.637 | 6.0 ± 0.1 | -1.0 ± 0.4 | 0.99787 |
| BPA | 0.009-0.471 | 10.9 ± 0.1 | 0.1 ± 0.3 | 0.99947 |
| PBP | 0.047-0.471 | 0.14 ± 0.02 | -0.05 ± 0.05 | 0.96357 |
| TCBPA | 0.011-0.559 | 2.75 ± 0.06 | -0.4 ± 0.2 | 0.99782 |
| TBBPA | 0.053-0.529 | 0.56 ± 0.06 | -0.4 ± 0.2 | 0.97476 |

Taula 3.7 Paràmetres de caracterització dels mètodes cromatogràfics MS i MS/MS.

Els resultats anteriors s'han obtingut per mitjà de calibratges per patró extern. Els resultats són lineals per a tots els compostos amb els dos mètodes i per a tot l'interval estudiat. No obstant, la quantificació de les mostres es durà a terme mitjançant un mètode de calibratge per patró intern per corregir la variabilitat deguda a la injecció. El compost utilitzat com a estàndard intern és el PCB-30 el qual apareix a un temps de retenció de 19.6 minuts i es pot quantificar amb els ions 256+258.

3.3.2 Optimització del mètode de derivatització

S'han assajat dues metodologies diferents per a la derivatització de compostos fenòlics. En primer lloc un mètode d'acetilació per reacció dels anàlits amb anhídrid acètic en medi

bàsic i posterior extracció dels derivats amb hexà mitjançant un procés LLE i, en segon lloc, la sililació d'aquestes substàncies amb tres reactius comercials, MTBSTFA, MSTFA i BSTFA. Les reaccions químiques associades a cada un d'aquests processos s'esquematitzen a la **Figura 3.8**.

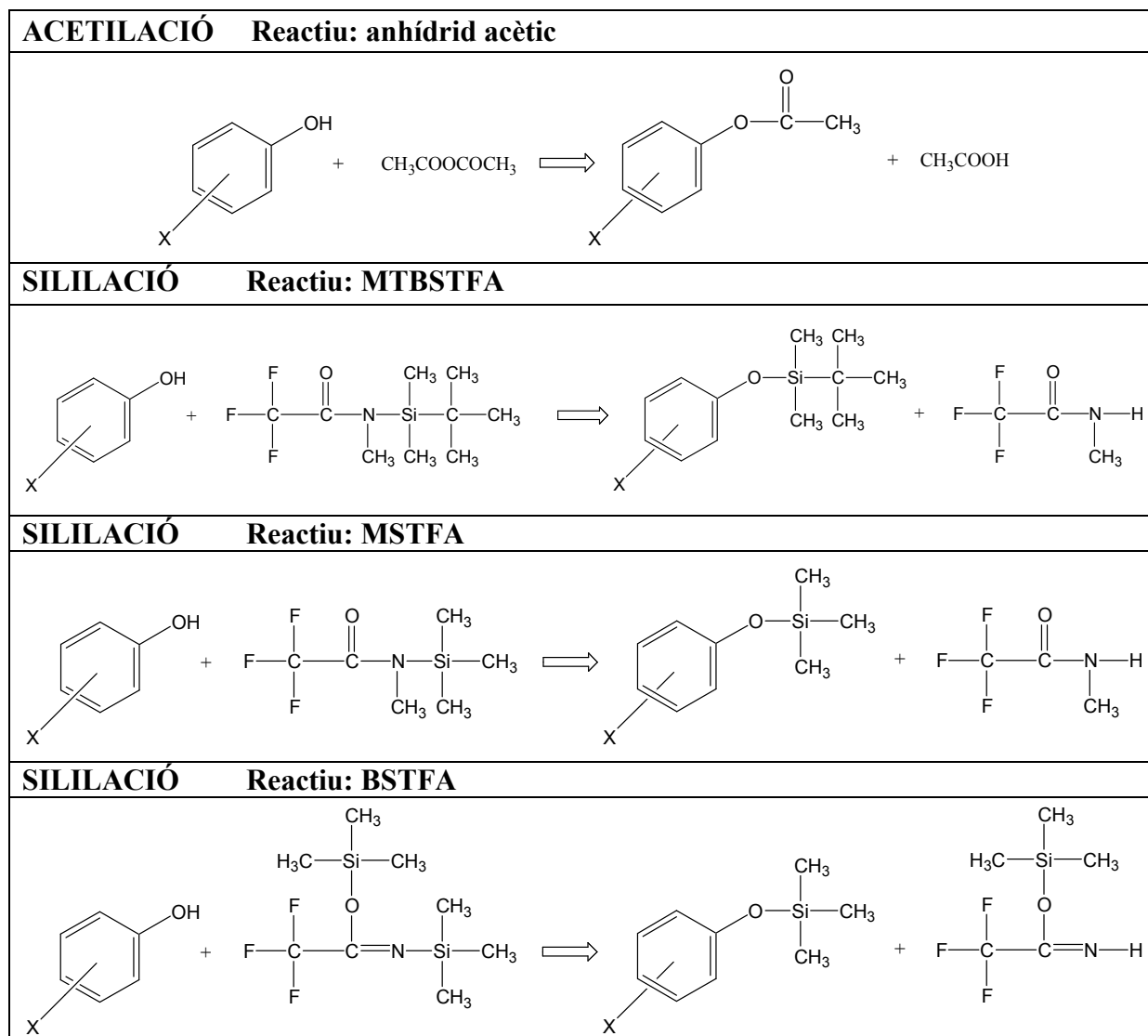


Figura 3.8 Reaccions químiques implicades en els processos de derivatització dels compostos fenòlics avaluats.

Primer de tot es compara el comportament cromatogràfic dels derivats acetilats i els derivats sililats. En general, els pics dels compostos fenòlics sililats presenten un comportament més gausià mentre que els pics dels derivats acetilats són més amples i amb cua. Aquest fet, lligat a que el procés d'acetilació és més complex perquè precisa de més

temps, ens va fer decantar cap a la sililació com a mètode de derivatització dels compostos fenòlics estudiats.

Com a agents sililants s'han avaluat tres reactius comercials, MTBSTFA, MSTFA i BSTFA. Totes tres substàncies contenen una meitat trifluoroacetamida i les dues últimes, tot i tenir diferent estructura, proporcionen el mateix tipus de derivat: substitueixen l'hidrogen del grup OH dels fenols per un grup trimetilsilil. El primer derivatitzant, MTBSTFA, per la seva banda, reemplaça l'hidrogen fenòlic per un grup *tert*-butildimetilsilil. En primer lloc es va voler comparar el comportament cromatogràfic dels pics dels derivats obtinguts amb cadascun d'ells. El comportament que presenten els derivats formats a partir de MSTFA i BSTFA és el mateix tal com era d'esperar degut a que aquests dos agents derivatitzants formen el mateix tipus de compostos. La resolució observada entre els pics de 26DBP i 24DBP i 2B4MP i 4B3MP (els quals tenen temps de retenció molt semblants dos a dos) és molt millor en utilitzar MSTFA o BSTFA que en derivatitzar amb MTBSTFA, tal com es pot veure a la **Figura 3.9**.

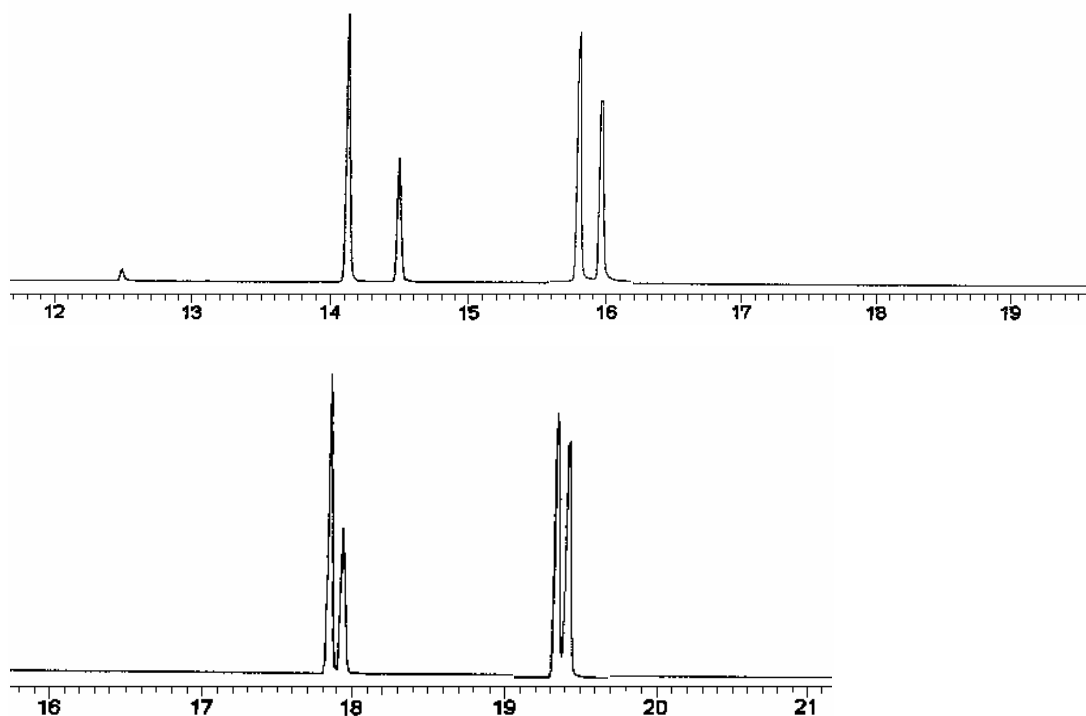


Figura 3.9 Resolucions obtingudes entre els pics de 26DBP i 24DBP (esquerra) i 2B4MP i 4B3MP (dreta) en dur a terme la derivatització dels fenols, a **dalt** amb MSTFA i a **baix** amb MTBSTFA.

La **Figura 3.10** mostra els senyals GC-MS obtinguts en derivatitzar una mescla que conté els deu anàlits a concentracions que van des de 2.5 a 6.8 mg·L⁻¹ amb 50 µL de MTBSTFA, MSTFA o BSTFA.

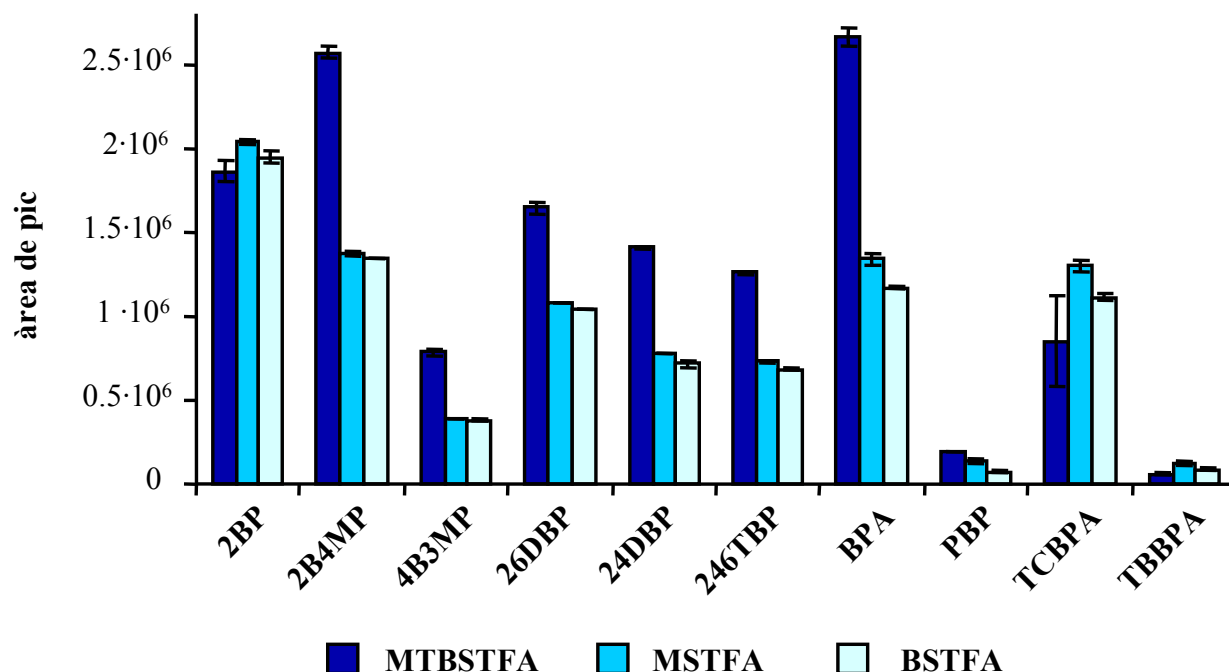


Figura 3.10 Senyals obtinguts en la derivatització d'una mescla dels deu anàlits amb els tres derivatitzants avaluats.

El primer que ens crida l'atenció a l'observar la **Figura 3.10** és que els senyals obtinguts amb MTBSTFA per a la majoria de compostos són superiors als aconseguits amb els altres dos derivatitzants, els quals proporcionen, en general, àrees similars per a tots els fenols. Aquest fet es deu a que, amb aquest derivatitzant (MTBSTFA), els pesos moleculars dels derivats formats són més grans que per als altres dos al presentar aquests una meitat *tert*-butílica; un increment en el pes molecular es tradueix en un augment de la sensibilitat. No obstant, aquests pesos moleculars es troben, per als derivats més pesants, per sobre del rang *m/z* que podem analitzar amb l'aparell utilitzat pel que tenim problemes en la quantificació de PBP, TCBPA i TBBPA.

S'ha estudiat l'efecte de l'addició d'acetona, metanol i aigua durant el procés de derivatització dels compostos fenòlics amb els tres agents sililants (**Figura 3.11**)

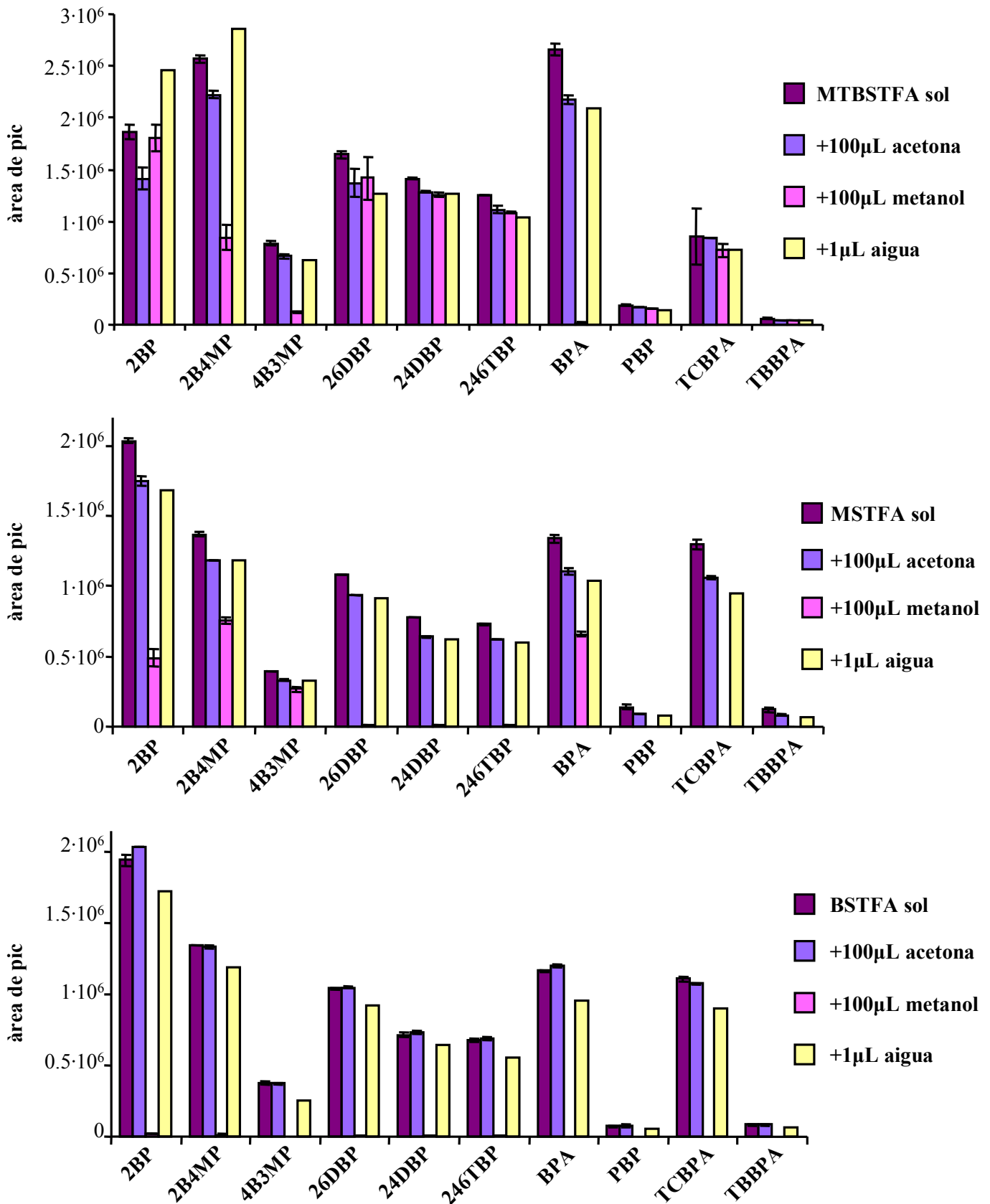


Figura 3.11 Efecte de l'addició d'acetona, metanol i aigua en la derivatització de compostos fenòlics amb MTBSTFA, MSTFA i BSTFA.

Dels gràfics anteriors podem deduir que, en molts casos, la presència d'acetona, metanol o aigua en el medi de reacció provoca una disminució del seu rendiment. Aquesta disminució és més marcada en el cas de tenir metanol ja que aquest solvent també conté un grup hidroxil susceptible a ser transformat i part del derivatitzant es consumeix per reacció amb ell. El mateix efecte és el que es pot observar com a conseqüència de la presència d'aigua. Les traces d'aigua, ja sigui perquè el medi de reacció conté aquesta substància o altres solvents que en continguin en petita proporció, també tenen un efecte negatiu sobre els derivats un cop formats ja que aquests acostumen a ser sensibles a la hidròlisi. Aquest efecte és menys acusat en treballar amb MTBSTFA donat que la presència del grup *tert*-butil voluminos fa que l'enllaç Si-O quedi protegit enfront la hidròlisi, però decidim descartar aquest reactiu pels problemes que ens ocasiona en la quantificació dels compostos més pesants. En comparar els resultats obtinguts per a MSTFA i BSTFA, podem veure que ambdós presenten una sensibilitat semblant però que els derivats formats amb BSTFA són menys estables, sobretot en presència de metanol, el que provoca que desapareguin gairebé tots els pics. Per totes aquestes raons decidim treballar amb el derivatitzant MSTFA.

La optimització de les condicions de derivatització s'ha dut a terme mitjançant un disseny experimental de tipus factorial a dos nivells, amb tres factors: volum de derivatitzant (20-200 µL), temps (0.5-2 hores) i temperatura (40-80 °C). El nombre total d'experiments a realitzar són 11 ($2^3=8$, més 3 punts centrals) (**Taula 3.8**).

| experiment | temps (h) | temperatura (°C) | volum derivatitzant (µL) |
|------------|-----------|------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 80 | 20 |
| 2 | 0.5 | 40 | 20 |
| 3 | 0.5 | 80 | 20 |
| 4 | 1.25 | 60 | 110 |
| 5 | 2 | 40 | 200 |
| 6 | 2 | 40 | 20 |
| 7 | 0.5 | 40 | 200 |
| 8 | 2 | 80 | 200 |
| 9 | 0.5 | 80 | 200 |
| 10 | 1.25 | 60 | 110 |
| 11 | 1.25 | 60 | 110 |

Taula 3.8 Condicions experimentals per a cada un dels experiments a realitzar en l'optimització de les condicions de derivatització.

Les mostres utilitzades en aquests experiments són alíquotes d'extracte procedent d'un procés d'extracció en fase sòlida d'aigua residual fortificada amb els deu anàlits a un nivell de concentració entre 10 i 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Per a cada experiment s'han agafat 500 μL d'extracte SPE, 100 μL d'una solució de PCB-30 (estàndard intern) de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, el volum indicat de MSTFA i el volum necessari d'acetat d'etil fins arribar a 1 mL. Els resultats obtinguts en el disseny es representen com a àrees relatives de cada compost respecte a l'àrea del patró intern (**Figura 3.12**).

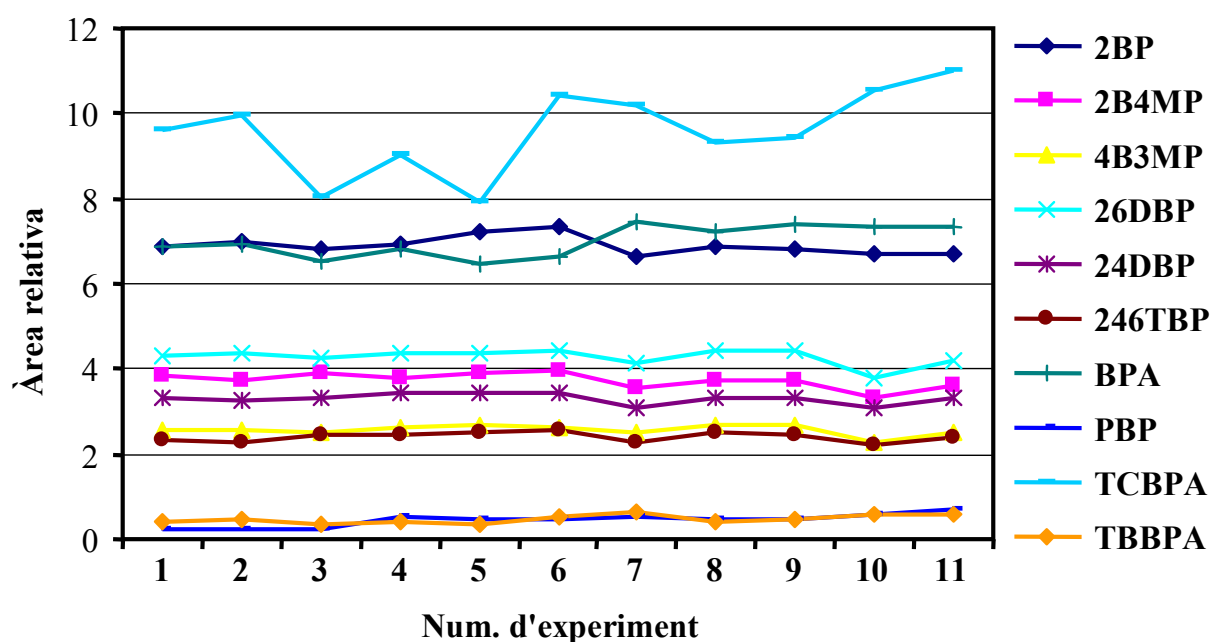


Figura 3.12 Resultats obtinguts en l'optimització de les variables que afecten al procés de derivatització.

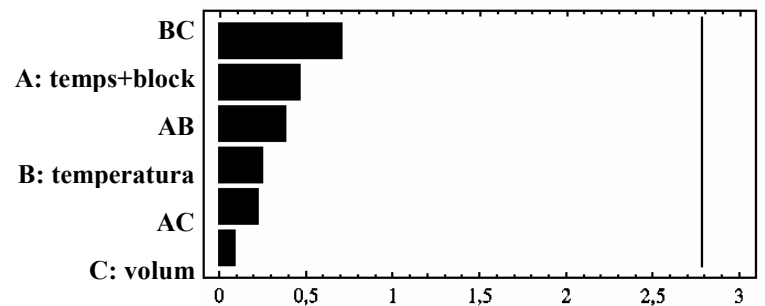
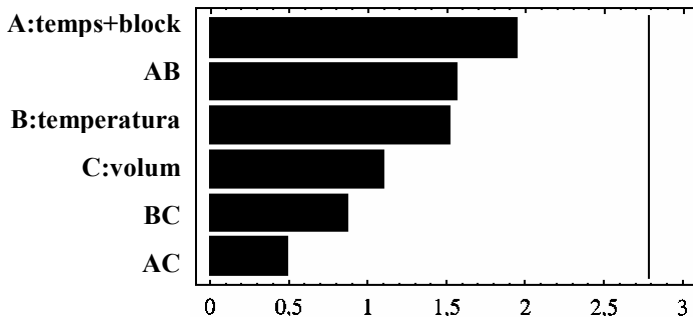
L'anàlisi dels resultats obtinguts després de realitzar els 11 experiments dona lloc a les Cartes Pareto per a cada compost. Les de 2BP i 26DBP es mostren com a exemple a la **Figura 3.13**. Les barres horitzontals ens indiquen l'efecte de cada variable o combinació de variables. Si el valor de l'efecte és inferior al marcat amb una línia vertical significa que aquestes variables no són estadísticament significatives a un nivell de confiança del 95%. Aquest comportament es repeteix per a tots els anàlits i totes les variables o combinacions de les mateixes indicant que variacions en el t, T o V de derivatitzant no modifiquen de forma significativa el rendiment de la reacció de derivatització. A la **Figura 3.13** també apareixen els gràfics d'efectes principals i d'interaccions entre variables. Si ens fixem en el 26DBP, el seu gràfic d'efectes principals ens indica que un augment del temps i de la temperatura es

tradueix en un augment del senyal (major per al cas del temps degut al pendent superior de la recta) mentre que un augment del volum de MSTFA provoca una petita disminució de la resposta, tot això tenint en compte que en cap cas les variacions són estadísticament significatives a un 95% de confiança. Pel que fa al gràfic d'interaccions entre variables, línies paral·leles ens indiquen que no hi ha interacció mentre que línies que es creuen vol dir que sí que n'hi ha. Per a l'exemple del 26DBP, si ens fixem en la interacció entre les variables B (temperatura) i C (volum de derivatitzant), podem dir que quan B val 40°C, la resposta per aquest compost augmenta quan la variable C passa del seu valor més alt (+) al seu valor més baix (-) mentre que quan B és de 80°C, la resposta del 26DBP disminueix quan la variable C passa del seu valor més alt (+) al seu valor més baix (-).

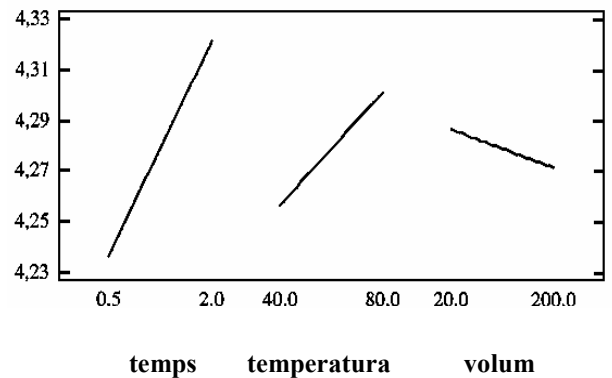
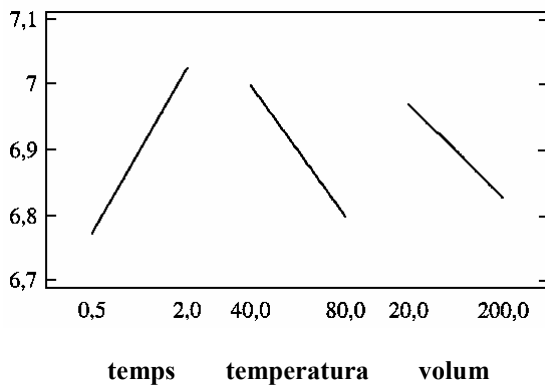
(A: 2-bromofenol)

(B: 2,6-dibromofenol)

CARTES PARETO



GRÀFICS D'EFECTES PRINCIPALS



GRÀFICS D'INTERACCIONS ENTRE VARIABLES

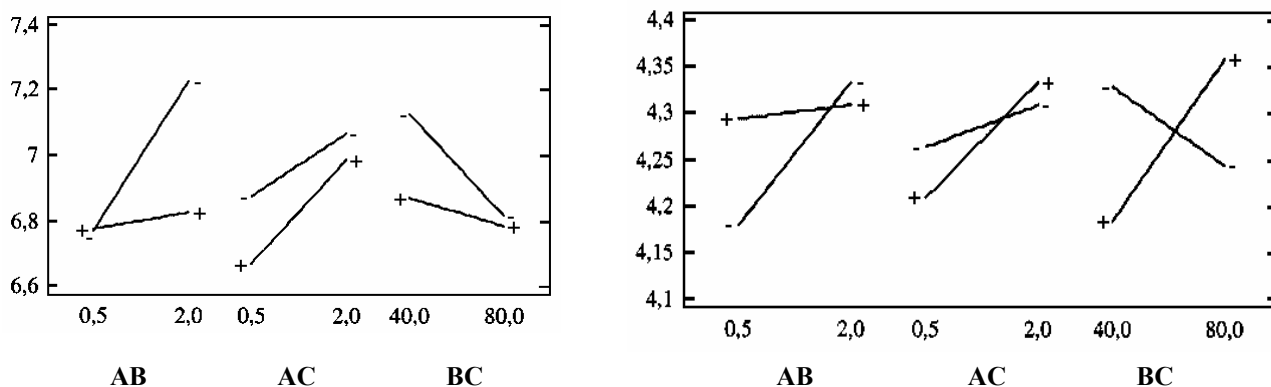


Figura 3.13 Estudi estadístic de l'optimització de les característiques de derivatització per a A) 2-bromofenol i B) 2,6-dibromofenol.

La sililació de compostos fenòlics amb MSTFA és un procés que té lloc de forma immediata al posar en contacte els compostos de partida amb l'agent derivatitzant. Podem fer aquesta constatació després de comprovar que la derivatització pot tenir lloc en el propi injector del cromatògraf. Si aspirem, mitjançant una xeringa per a cromatografia de gasos, 1 μL d'extracte SPE (igual a l'utilitzat en el disseny experimental), 1 μL d'aire, 0.5 μL de MSTFA i ho injectem tot junt, obtenim un cromatograma on apareixen els pics de tots els derivats fenòlics amb unes àrees equivalents a les obtingudes en el disseny, fet que ens confirma que el rendiment de la reacció en aquesta prova i en els 11 experiments del disseny és el mateix. Aquest comportament ja havia estat observat per Basheer et al. [56] emprant un altre reactiu sililant, BSTFA. Per altra banda, s'ha demostrat que la temperatura de l'injector tampoc influeix de forma significativa en el procés de derivatització tal com es pot deduir de la **Figura 3.14**.

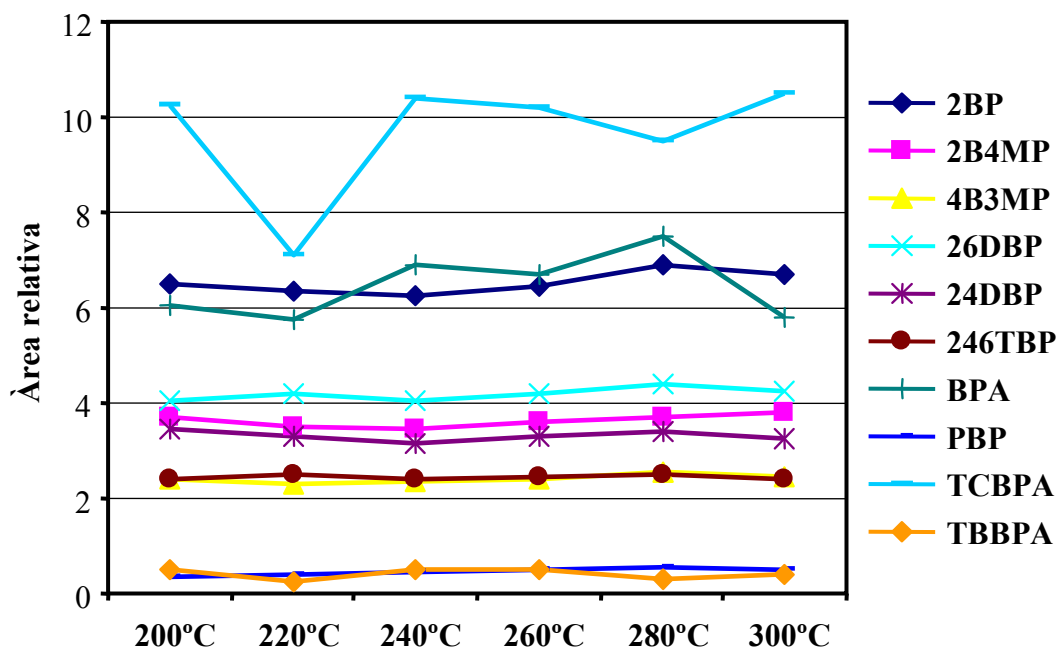
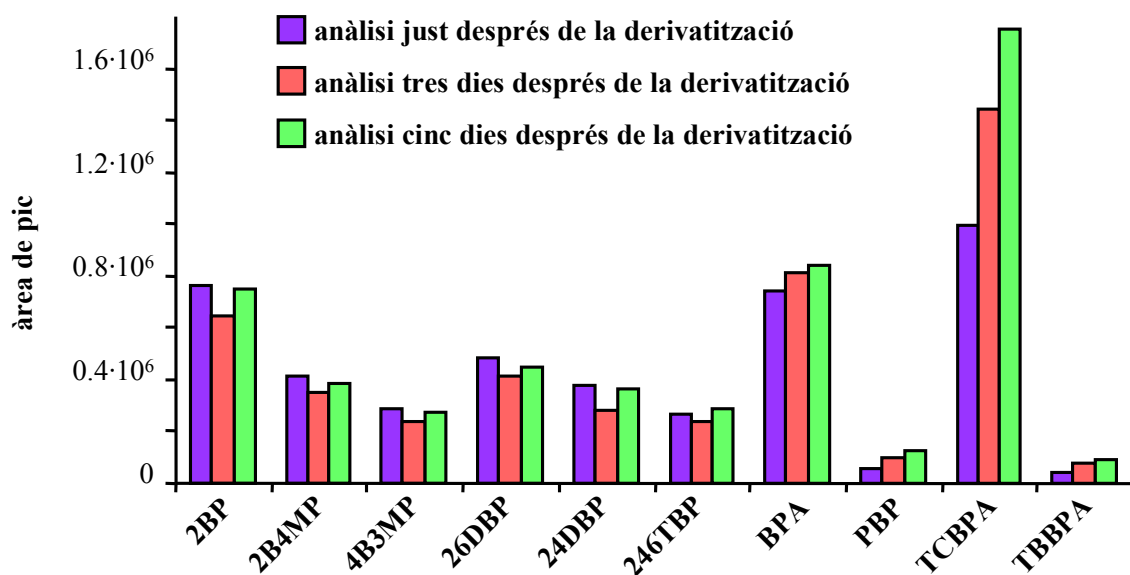
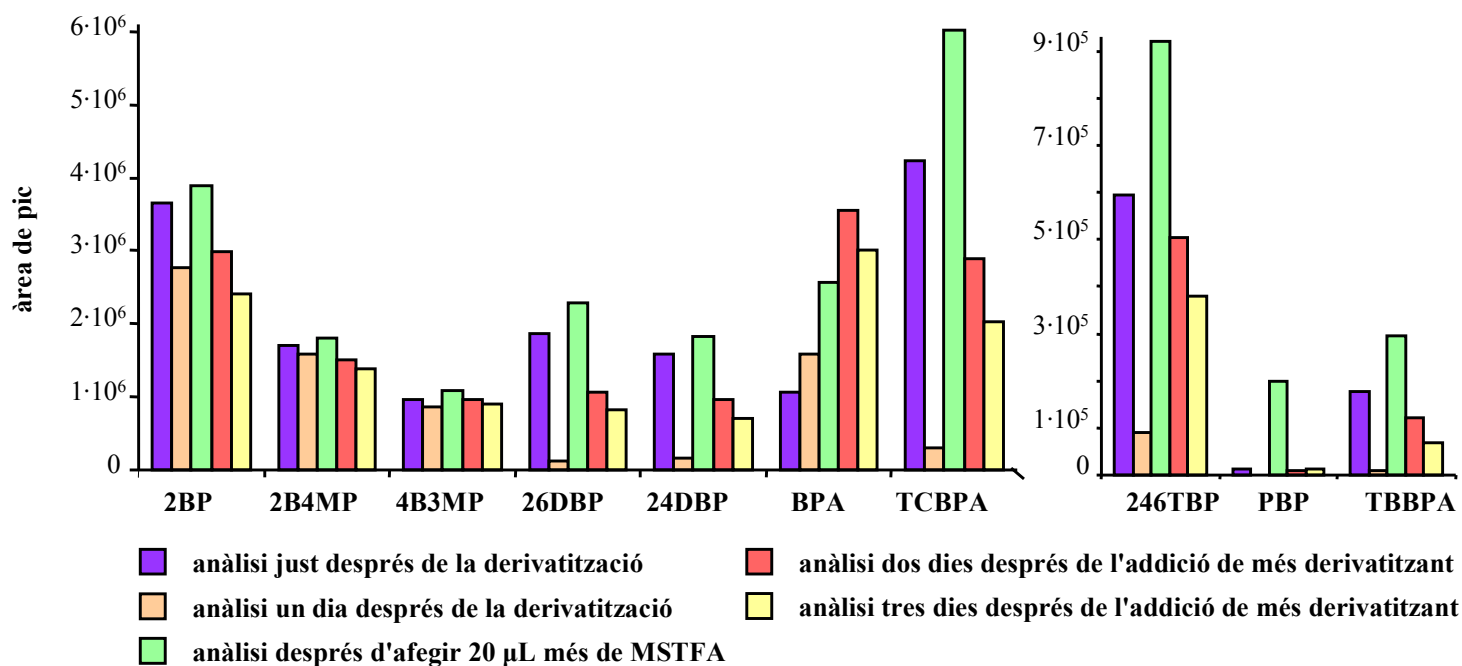
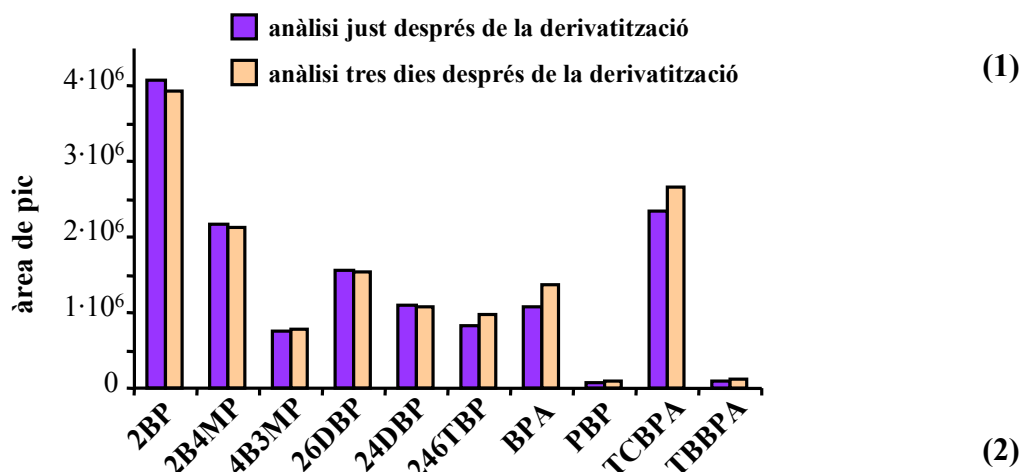


Figura 3.14 Efecte de la temperatura d'injecció en la derivatització de fenols amb MSTFA.

Després de determinar les condicions òptimes per tal de dur a terme la derivatització de compostos fenòlics amb MSTFA, s'han conduït estudis per avaluar l'estabilitat dels derivats un cop formats. La **Figura 3.15** recull un seguit de gràfics en els quals es mostren els resultats d'aquests estudis. En el gràfic (1) es mostren les àrees obtingudes per a tots els compostos en derivatitzar, amb 20 μL de MSTFA, 1 mL d'una solució patró preparada en acetat d'etil a concentracions entre 4 i 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquesta solució estàndard s'analitza just després de la derivatització i tres dies després i les respostes obtingudes en els dos casos són equivalents demostrant que, en aquest cas, no s'ha produït degradació dels derivats. En el gràfic (2) es du a terme també un estudi d'estabilitat dels derivats al llarg del temps però utilitzant ara un extracte final en acetat d'etil procedent de l'extracció en fase sòlida d'un litre d'aigua MilliQ fortificat a un nivell de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ amb els deu compostos objecte d'estudi i processat tal com es descriu a l'apartat experimental. Es comparen les àrees obtingudes després de derivatitzar també 1 mL de l'extracte amb 20 μL de MSTFA. En aquest cas, la degradació dels derivats és molt marcada si comparem les primeres i segones columnes de cada compost les quals corresponen, respectivament, a les respostes obtingudes en analitzar els extractes just després de la derivatització i al cap de 24 hores. Tal com podem veure, les àrees corresponents a l'anàlisi dut a terme només un dia després de la derivatització disminueixen dràsticament i, en alguns casos, fins i tot els derivats desapareixen.



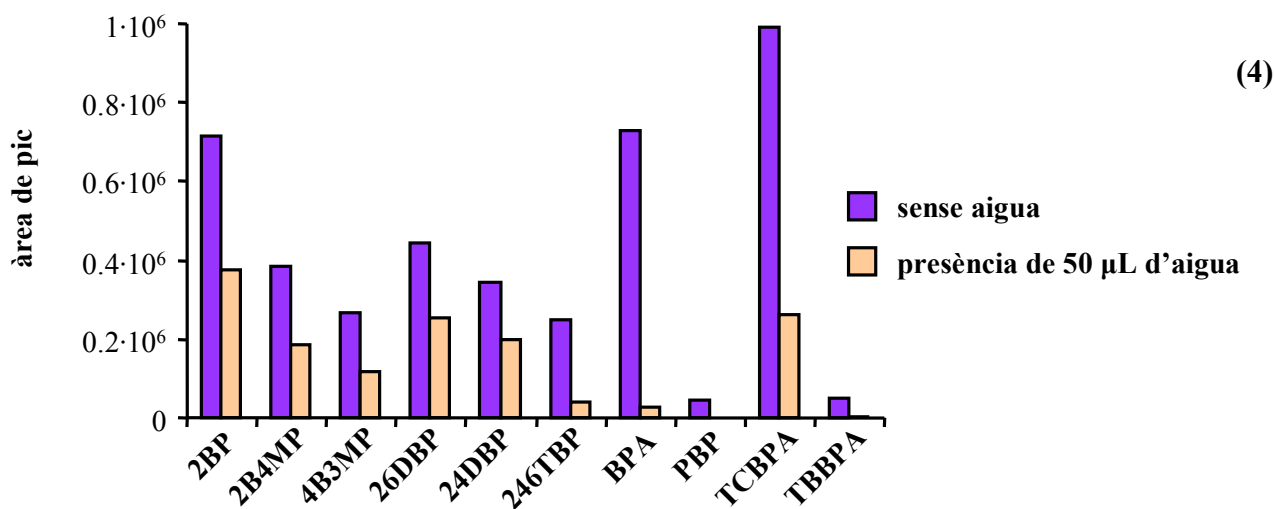


Figura 3.15 Estudis de degradació dels compostos fenòlics derivatitzats amb MSTFA. (1) Estudi de l'estabilitat d'un patró; (2) Estudi de l'estabilitat d'extractes SPE derivatitzats amb 20 µL de MSTFA; (3) Estudi de l'estabilitat d'extractes SPE derivatitzats amb 100 µL de MSTFA; (4) Estudi de la presència d'aigua en el medi de reacció.

Aquest comportament ens fa pensar que la presència de traces de substàncies utilitzades durant el procés SPE, com per exemple l'àcid clorhídric emprat per acidificar les mostres o l'acetona present a la solució de fenols utilitzada per a la fortificació de l'aigua, poden ser les causes d'aquesta degradació dels derivats. En el mateix gràfic s'estudia l'efecte d'afegir 20 µL de derivatitzant més (terceres columnes) i s'observa com les àrees es tornen a recuperar i que, si tornem a analitzar aquest extracte en dies posteriors, es torna a observar una disminució de les respostes (quartes i cinquenes columnes). Aquest comportament no s'observa si en comptes de 20 µL de MSTFA treballem amb 110 µL tal com es pot deduir del gràfic (3). En aquest cas, que s'ha estudiat també amb extracte SPE, no s'observa degradació dels derivats analitzant els extractes cinc dies després de la derivatització. Un punt que és molt crític és la presència d'aigua en el medi de reacció. El gràfic (4) mostra l'efecte de l'addició de 50 µL d'aigua a un extracte SPE obtingut a partir de l'extracció de 500 mL d'aigua residual fortificada a concentracions de 10 µg·L⁻¹. La presència de traces d'aigua disminueix l'eficàcia de la derivatització. Per tant, al dur a terme les proves de preconcentració de compostos fenòlics per SPE haurem d'assecar bé els cartutxos abans de realitzar l'elució perquè no hi quedin restes de la mostra aquosa.

Així doncs, tot i que el disseny experimental mostra que no existeixen diferències significatives en el rendiment de la reacció de derivatització al utilitzar volums de MSTFA entre 20 i 200 µL, ens convé treballar com a mínim amb 110 µL per aconseguir que els

derivats formats siguin estables al llarg del temps. Igualment, a l'haver comprovat que la derivatització pot tenir lloc a l'injector del cromatògraf immediatament després de posar en contacte els anàlits amb el derivatitzant, no és necessari sotmetre la mescla a un temps de reacció de 30 minuts que és el temps mínim avaluat en el disseny experimental.

Per tant, a partir d'ara duem a terme la derivatització dels compostos fenòlics amb 110 μL de derivatitzant MSTFA directament dins un vial àmbar al mostrejador del cromatògraf de gasos.

Pel que fa als espectres de masses dels fenols derivatitzats amb MSTFA, el pic de l'ió molecular per a cada compost hauria de correspondre al seu pes molecular més un valor de 72 unitats, corresponent a la pèrdua d'un hidrogen i a la presència del grup trimetilsilil (73 unitats), però té lloc la pèrdua d'un grup CH_3 de 15 unitats de forma immediata. Per això, el pic més intens dels espectres obtinguts serà $(M+57)$ (on M és el pes molecular de cadascun dels compostos fenòlics), sempre tenint en compte les variacions degudes a la presència de Br, que dona lloc a un patró característic en funció del número d'àtoms a cada compost.

3.3.3 Preconcentració de compostos fenòlics per SPE

Un cop optimitzats els paràmetres de derivatització i anàlisi dels deu compostos fenòlics estudiats, s'han dut a terme estudis de preconcentració d'aquests compostos mitjançant extracció en fase sòlida utilitzant un cartutx comercial de divinilbenzè i N-vinilpirrolidona (Oasis HLB). L'estructura i les característiques físiques d'aquesta matriu sòlida es resumeixen a la **Figura 3.16**.

| Paràmetre | Valor |
|------------------------------|--|
| Massa de sorbent per cartutx | 60 mg |
| Volum de porus | $1.3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ |
| diàmetre de porus | 80 Å |
| diàmetre de partícula | 30 μm o 60 μm |
| àrea superficial específica | $810 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ |

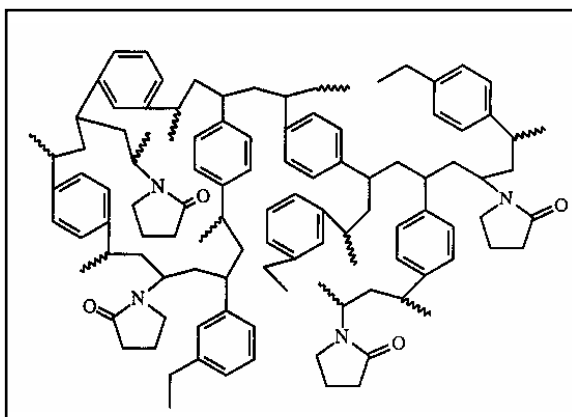


Figura 3.16 Estructura i propietats físiques del sorbent Oasis HLB.

S'han utilitzat mostres d'aigua MilliQ i aigües residuals procedents de la sortida de l'estació depuradora de Silvouta, la qual recull les aigües de desfet de la ciutat de Santiago de Compostela. Aquestes aigües s'han fortificat a diferents nivells de concentració i s'han processat tal i com s'exposa a la part experimental i derivatitzat i analitzat en les condicions optimitzades als apartats anteriors.

En primer lloc s'ha comprovat si s'assolia el volum de trencament de la fase sòlida percolant 2 litres d'aigua MilliQ fortificada a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a través de dos cartutxos Oasis disposats en sèrie. Els dos cartutxos s'han eluït per separat amb 3 mL d'acetat d'etil i s'han analitzat. L'eluent procedent del segon cartutx no conté compostos fenòlics, fet que ens indica que en les condicions experimentals utilitzades (2 L , $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no s'ha assolit el volum de trencament del sorbent.

Pel que fa a les proves de preconcentració, s'han assajat dos nivells de fortificació diferents, 5 i $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per a l'aigua MilliQ (1 L) i $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per a l'aigua residual (0.5 L) i els resultats per a ambdues matrius es poden veure a la **Taula 3.9** i la **Taula 3.10**. Els extractes s'han analitzat emprant el mètode de GC-MS. Fins i tot en aquells casos en que es treballa a nivells de concentració més baixos s'ha pogut quantificar els anàlits i els valors de desviació estàndard relativa són acceptables, demostrant que el mètode és reproducible. Destaca el valor de 170% obtingut per a 2-bromo-4-metilfenol en aigua residual degut a que aquest compost apareix juntament amb una interferència en aquesta matriu. Aquest problema podria ésser resolt fàcilment amb l'aplicació del mètode de GC-MS/MS.

| | AIGUA MILLIQ | | | |
|---------------|---|---------|---|---------|
| | fortificació: $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | | fortificació: $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | |
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) |
| 2BP | 77 | 5 | 87 | 3 |
| 2B4MP | 107 | 5 | 111 | 3 |
| 4B3MP | 89 | 4 | 84 | 4 |
| 26DBP | 76 | 3 | 73 | 3 |
| 24DBP | 82 | 5 | 78 | 2 |
| 246TBP | 79 | 8 | 74 | 3 |
| PBP | 106 | 16 | 98 | 7 |
| BPA | 91 | 4 | 80 | 4 |
| TCBPA | 96 | 8 | 79 | 6 |
| TBBPA | 83 | 17 | 72 | 8 |

Taula 3.9 Recuperacions obtingudes ($n=4$) en la preconcentració de compostos fenòlics presents en 1 L d'aigua MilliQ a dos nivells de concentració.

| AIGUA RESIDUAL | | |
|---|--------------|----------------|
| fortificació: 10 µg·L⁻¹ | | |
| | R (%) | RSD (%) |
| 2BP | 126 | 1 |
| 2B4MP | 170 | 2 |
| 4B3MP | 105 | 2 |
| 26DBP | 93 | 2 |
| 24DBP | 100 | 2 |
| 246TBP | 99 | 2 |
| PBP | 96 | 9 |
| BPA | 107 | 2 |
| TCBPA | 85 | 2 |
| TBBPA | 105 | 8 |

Taula 3.10 Recuperacions obtingudes (n=4) en la preconcentració de compostos fenòlics presents en 0.5 L d'aigua residual.

S'han calculat els límits de quantificació del mètode instrumental (GC-MS) a partir de la relació senyal/soroll d'un patró de compostos fenòlics, tal com ja hem vist en optimitzar el mètode GC-MS/MS. Tenint en compte els factors de preconcentració aconseguits s'han pogut calcular, de forma aproximada, els límits de quantificació del mètode d'anàlisi total. Els resultats corresponents a aquest estudi es recullen a la **Taula 3.11**.

| Compost | Conc. patró (mg·L⁻¹) | àrea patró | s/n patró | LOQ instrumental (µg·L⁻¹) | LOQ mètode (ng·L⁻¹) |
|----------------|--|-------------------|------------------|---|---------------------------------------|
| 2BP | 0.26 | 30931 | 350 | 7 | 9 |
| 2B4MP | 0.18 | 19073 | 680 | 3 | 3 |
| 4B3MP | 0.09 | 7541 | 150 | 6 | 7 |
| 26DBP | 0.12 | 16648 | 300 | 4 | 5 |
| 24DBP | 0.13 | 10652 | 99 | 13 | 16 |
| 246TBP | 0.12 | 12018 | 240 | 5 | 6 |
| BPA | 0.09 | 11563 | 210 | 4 | 5 |
| PBP | 0.09 | 3686 | 65 | 13 | 15 |
| TCBPA | 0.11 | 57469 | 500 | 2 | 3 |
| TBBPA | 0.10 | 3132 | 20 | 50 | 60 |

Taula 3.11 Límits de quantificació instrumentals i del mètode d'anàlisi calculats per GC-MS

Els límits de quantificació calculats per a l'extracció en fase sòlida, derivatització i anàlisi per GC-MS de fenols es troben en el rang de les ppt. Tenint en compte les variacions associades a l'etapa d'extracció en fase sòlida i a la derivatització, els límits de quantificació reals es trobaran per sobre dels valors indicats, però podem assumir que encara es situaran en el rang de les ppt. Aquests valors permeten quantificar aquests compostos a nivells per sota de les concentracions màximes permises en aigües. El mètode desenvolupat, per tant, és adient per a l'anàlisi de compostos bromofenòlics i bisfenòlics de tipus A i proporciona bones reproductibilitats i límits de quantificació. Al aplicar el mètode a aigües residuals fortificades s'han obtingut recuperacions quantitatives, el que indica la validesa del mètode desenvolupat per a l'anàlisi d'aquest tipus de mostres.

3.4 REFERÈNCIES

1. M. McMaster, C. McMaster, *GC/MS. A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1998), ISBN 0-471-24826-6.
2. F.J. Santos, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 125.
3. H.-J. Hübschmann, *Handbook of GC/MS. Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemanya) (2001), ISBN 3-527-30170-4.
4. M. Oehme, *Practical Introduction to GC-MS with Quadrupoles*, Hüthig, Heidelberg (Alemanya) (1998), ISBN 3-7785-2602-2.
5. D.A. Skoog, J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, McGraw-Hill, Madrid (Espanya) (1994) ISBN 84-481-0191-X.
6. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester (Anglaterra) (2002), ISBN 0-471-48566-7.
7. R. Graham, G. Chen, P. Wong, H. Wollnik, *Encyclopedia of Applied Physics*, Vol. 19, VCH Publishers (1997), ISBN 3-527-29300-0.
8. M. Saitta, S. Lo Curto, F. Salvo, G. Di Bella, G. Dugo, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 335.
9. R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 143.
10. P.M. Hoai, S. Tsunoi, M. Ike, Y. Kuratani, K. Kudou, P.H. Viet, M. Fujita, M. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 161.
11. M.D. Hernando, M. Mezcua, M.J. Gómez, O. Malato, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 129.
12. D.R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1979), ISBN 0-471-03469-X.
13. J.M. Rosenfeld, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 19.
14. H. Bagheri, M. Saraji, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 87.
15. H. Bagheri, M. Saraji, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 111.
16. H. Bagheri, A. Mohammadi, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 23.
17. A. Vermeulen, K. Welvaert, J. Vercammen, *J. Chromatogr. A*, en premsa.
18. M.L. Bao, F. Pantani, K. Barbieri, D. Burrini, O. Griffini, *Chromatographia* 42 (1996) 227.

19. L.E. Sojo, J.D. Djauhari, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 21.
20. T.M. Pizzolato, J.L. Foschiera, E. Benvenuti, F. Gomes, A.M. Geller, A. Lopes, M. Do C. Ruaro Peralba, J.H.Z. dos Santos, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1180.
21. M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 137.
22. P. Barták, L. Cáp, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 171.
23. M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 19.
24. S. Nakamura, S. Daishima, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 291.
25. M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 41.
26. B. Tienpont, F. David, K. Desmet, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 46.
27. S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 15.
28. A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 141.
29. M. Czaplicka, *Chromatographia* 53 (2001) S470.
30. M. Ramil Criado, S. Pombo da Torre, I. Rodríguez Pereiro, R. Cela Torrijos, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 155.
31. S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K.K. Verma, *Analyst* 126 (2001) 1663.
32. C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 282.
33. C. Thomsen, K. Janák, E. Lundanes, G. Becher, *J. Chromatogr. B* 750 (2001) 1.
34. C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 129.
35. C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1414.
36. S. Nakamura, M. Takino, S. Daishima, *Analyst* 126 (2001) 835.
37. H.M. Kuch, K. Ballschmiter, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3201.
38. Y. Hanada, I. Imaizumi, K. Kido, T. Tanizaki, M. Koga, H. Shiraishi, M. Soma, *Anal. Sci.* 18 (2002) 655.
39. Z. Kuklennyik, J. Ekong, C.D. Cutchins, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6820.
40. J.M. Halket, V.G. Zaikin, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 1.
41. T. Heberer, H.-J. Stan, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 21.
42. H.G.J. Mol, S. Sunarto, O.M. Steijger, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 97.
43. H. Kim, J.-K. Hong, Y.-H. Kim, K.-R. Kim, *Arch. Pharm. Res.* 26 (2003) 697.
44. M.I.H. Helaleh, S. Fujii, T. Korenaga, *Talanta* 54 (2001) 1039.

45. D. Li, J. Park, J.-R. Oh, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3089.
46. H.-W. Kuo, W.-H. Ding, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 67.
47. R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 179.
48. M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Anal. Chim. Acta* 428 (2001) 227.
49. A. Zafra, M. del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Water Res.* 37 (2003) 735.
50. A. González-Casado, N. Navas, M. del Olmo, J.L. Vilchez, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 565.
51. J.L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. del Olmo, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 31.
52. K.-R. Kim, H. Kim, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 87.
53. T. Henriksen, B. Svensmark, B. Lindhardt, R.K. Juhler, *Chemosphere* 44 (2001) 1531.
54. M. Kojima, S. Tsunoi, M. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 1.
55. J. Rolfes, J.T. Andersson, *Anal. Commun.* 33 (1996) 429.
56. C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 163.

CAPÍTOL 4

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ D'ONZE COMPOSTOS FENÒLICS CONSIDERATS CONTAMINANTS PRIORITARIS PER LA EPA EN SÒLS

| | |
|--|------------|
| 4.1 INTRODUCCIÓ | 147 |
| 4.1.1 Mètodes d'extracció de fenols en sòls | 148 |
| 4.1.1.1 Mètodes tradicionals..... | 149 |
| 4.1.1.2 Mètodes instrumentals..... | 150 |
| 4.1.2 Interferències associades a l'extracció de sòls..... | 153 |
| 4.2 EXPERIMENTAL | 157 |
| 4.2.1 Reactius..... | 157 |
| 4.2.2 Aparells i material..... | 158 |
| 4.2.3 Procediment experimental | 159 |
| 4.2.3.1 Anàlisi dels compostos fenòlics | 159 |
| 4.2.3.2 Mostres de sòl..... | 160 |
| 4.2.3.3 Extracció del sòl | 160 |
| 4.2.3.3.1 Extracció alcalina..... | 160 |
| 4.2.3.3.2 Extracció Soxhlet..... | 161 |
| 4.2.3.4 Preconcentració dels extractes per SPE..... | 161 |
| 4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ | 162 |
| 4.3.1 Caracterització del sòl..... | 162 |
| 4.3.2 Caracterització del mètode | 163 |
| 4.3.2.1 Avaluació de l'etapa d'extracció | 163 |
| 4.3.2.2 Avaluació de l'etapa de <i>clean-up</i> | 163 |
| 4.3.2.3 Efecte de la concentració i la massa de sòl..... | 167 |
| 4.3.2.4 Validació del mètode..... | 169 |
| 4.3.2.5 Estudis de degradació de compostos fenòlics | 171 |
| 4.4 REFERÈNCIES | 177 |

4.1 INTRODUCCIÓ

El sòl, tot i constituir un percentatge elevat del conjunt del planeta, és un bé escàs alhora que representa el primer destí dels productes de desfet procedents de l'activitat humana i industrial. Conservar el sòl en bon estat és essencial per mantenir l'equilibri existent en el nostre ecosistema. El sòl, en primer lloc, és l'hàbitat natural de la majoria d'espècies vegetals i animals i les seves propietats sovint condicionen el tipus de vida que s'hi desenvolupa. Al mateix temps, funciona com a sistema de reciclatge de la natura, assimilant els organismes morts i fent que serveixin de nutrients per als que estan creixent. En segon lloc, les característiques del sòl són el principal factor que controla el destí de l'aigua en el seu cicle hidrològic. Per últim, i sens dubte no menys important, el sòl és el medi on l'home ha assentat

tota la seva estructura de vida, des de cada edifici fins a carreteres, aeroports, cultius, etc. [1]. Per totes aquestes raons és clau controlar els productes químics que s'aboquen al sòl ja siguin plaguicides, residus industrials o productes derivats de l'ús domèstic, que moltes vegades es llencen sense control. Aquests productes, sovint anomenats xenobiòtics, perquè són estranys al món viu, poden ser inerts i inofensius o, per contra, produir danys biològics importants, fins i tot quan es troben a concentracions baixes.

Un cop arriben al sòl, els productes químics poden seguir diferents camins. Poden volatilitzar-se o ser adsorbits per alguns dels components del sòl com les argiles o la matèria orgànica, percolar-se i arribar als aqüífers o aigües subterrànies, es poden produir reaccions químiques en el sí del sòl que causin la seva descomposició o transformació en altres productes, en alguns casos encara més perillosos que els propis productes de partida, ser biodegradats per microorganismes, patir rentats de la superfície del sòl i es poden incorporar als corrents d'aigua o rius o, en el pitjor dels casos, ser assimilats per animals o plantes i d'aquesta manera entrar a formar part de la cadena tròfica.

El ritme en el que el sòl és destruït o inutilitzat de les seves funcions bàsiques és, en general, superior al de creació de nou sòl útil. Aquest fet provoca la necessitat de frenar els processos pels quals els sòls perden les seves característiques i alhora s'han de desenvolupar mètodes que ajudin a la recuperació d'aquells que ja es troben contaminats, però abans d'iniciar polítiques de recuperació de sòls és necessari conèixer els nivells de contaminació que aquests contenen. El problema radica en que tot i saber que ha tingut lloc, ja sigui per accident o per negligència, un abocament d'una substància en un sòl, la quantitat d'aquesta que trobarem en la seva forma original vindrà condicionada per tots els processos descrits anteriorment. Ens podem trobar amb altres formes de la mateixa substància o productes de degradació, i aquesta és una de les raons per les que l'anàlisi de sòls és un procés complex.

A continuació es descriuran els mètodes més habituals d'extracció de productes químics presents en sòls fent èmfasi especialment en els compostos fenòlics, que són els que s'estudien en aquesta memòria

4.1.1 Mètodes d'extracció de fenols en sòls

L'extracció de contaminants orgànics de mostres sòlides o semisòlides ha estat àmpliament estudiada en els últims anys. Els mètodes desenvolupats es poden dividir en dues categories, els tradicionals, que normalment són més simples però consumeixen grans volums

de dissolvent, i els mètodes més nous, que tenen les avantatges d'una major velocitat d'extracció, reducció dels volums de solvents utilitzats, disminució del temps d'anàlisi i automatització, però que, per contra, requereixen de l'ús d'instruments que encareixen el preu de l'anàlisi i que, moltes vegades, no es troben a disposició de tots els laboratoris. En general, tots els mètodes es basen en el contacte de la mostra sòlida amb una solució que pot ser orgànica o aquosa. Per ajudar a l'extracció, en alguns d'ells s'aplica calor, pressió o una combinació dels dos, radiació electromagnètica per accelerar l'escalfament o ones de so per afavorir l'agitació de la mescla.

4.1.1.1 Mètodes tradicionals

Els mètodes d'extracció de sòls tradicionals o convencionals són l'**extracció amb soxhlet**, l'**extracció per agitació mecànica** i l'**extracció amb ajuda d'ultrasons**.

El soxhlet és la tècnica de referència per a l'extracció de sòls i és la que es recomana en molts mètodes oficials d'anàlisi. És un mètode en el que es treballa a reflux i que consumeix grans volums de dissolvents, generalment orgànics, per tal de dur a terme repetidament cicles d'extracció durant períodes que van des de les 8 a les 24 hores. Tot i ser un mètode tediós, requereix d'instrumental senzill i s'ha aplicat àmpliament a l'anàlisi de compostos fenòlics ja sigui com a mètode únic [2,3] o, en molts casos, com a mètode estàndard per comparar amb altres metodologies desenvolupades o ja conegudes però que s'apliquen en unes determinades condicions [4-6]. Existeix una variant del mètode soxhlet convencional en la que s'aconsegueix reduir en gran mesura el temps d'extracció i fins en un 80% el volum de solvents utilitzat. Coneguda com a **soxtec**, és una tècnica que consisteix en tres fases: contacte de la mostra sòlida amb el solvent en el seu punt d'ebullició durant aproximadament una hora, una segona etapa consistent en una extracció soxhlet normal però durant no més de 60 minuts i l'evaporació del dissolvent enriquit en els anàlits, tots tres passos emprant un mateix aparell [7].

L'ús de l'agitació mecànica, ja sigui orbital o circular, per posar en contacte la mostra sòlida amb l'extractant és la forma d'extracció més senzilla que es coneix. Cal escollir un dissolvent apropiat en funció de les característiques dels anàlits a extreure i el període d'agitació sol ser bastant més curt que per al cas del soxhlet. En el cas dels compostos fenòlics s'han utilitzat mescles metanol/aigua [8] o solucions àcides (àcid clorhídric) [6] encara que, aprofitant les propietats àcid-base que presenten els fenols, es poden extreure fàcilment en la seva forma fenolat mitjançant solucions alcalines [9-12]. Una manera

d'augmentar l'eficàcia del procés d'extracció per agitació mecànica és col·locant la mescla en un bany d'ultrasons o utilitzant una sonda d'ultrasons. En aquest cas, les ones sonores aplicades són les encarregades de produir l'agitació de la mescla sòl-dissolvent i s'aconsegueix que els temps de contacte siguin més curts. Solvents com diclorometà [13,14] o aigua [15] s'han aplicat per a l'extracció de compostos fenòlics de matrius sòlides fent ús dels ultrasons. Un inconvenient de les extraccions que utilitzen el contacte sòl-solució, ja sigui per agitació o ultrasons, és que el procés cal repetir-lo de dues a tres vegades amb extractant nou per aconseguir bones eficàcies. Això fa que el temps d'anàlisi i els volums de solvent, que s'han aconseguit reduir respecte al soxhlet, es tornin a allargar.

4.1.1.2 Mètodes instrumentals

En aquest grup s'han volgut incloure totes aquelles metodologies d'extracció de sòls més recents que incorporen l'ús d'instrumental més complex i l'aplicació, a més de temperatura, de pressió, radiació electromagnètica i solvents en el seu estat supercrític. De totes les metodologies que s'inclouen dins aquest grup, potser la més aplicada a l'anàlisi de fenols és l'**extracció assistida per microones** (MAE), ja sigui sota pressió, pMAE [16-18], o a pressió atmosfèrica, aMAE [19,20]. Les microones actuen escalfant la mostra de manera diferent als mètodes convencionals. En aquests últims, el primer que té lloc és l'escalfament del recipient i, poc a poc, la calor és transferida a la solució. Les microones, en canvi, concentren tota l'energia sobre la mostra (sense produir-se l'escalfament del recipient que la conté) i d'aquesta manera s'assoleix més ràpidament el punt d'ebullició del solvent i s'escurcen els temps d'extracció. No obstant, cal tenir en compte que els extractants escollits han de ser capaços d'absorbir les microones. En general s'utilitzen dissolvents orgànics convencionals però Mahugo Santana et al. [21] apliquen una tècnica MAE per a l'extracció de vuit compostos fenòlics utilitzant com a extractant un tensioactiu no iònic (èter de polioxietilen-6-lauril). Els paràmetres a controlar en un procés MAE són la pressió, el temps, el poder de la radiació i el volum i tipus d'extractant. Moltes vegades, degut al gran nombre de variables a optimitzar, s'apliquen tècniques quimiomètriques com el disseny experimental per tal de reduir el nombre d'experiments a realitzar [4,22]. A més, quan és necessari dur a terme derivatització dels compostos fenòlics prèviament a la seva detecció, és possible incorporar els reactius derivatitzants dins els reactors de microones perquè l'extracció i la derivatització tinguin lloc en un sol pas [23]. Tot i que fins ara només ens hem referit a l'extracció de compostos fenòlics, els mètodes MAE s'han aplicat extensament a nombrosos

grups i famílies de compostos com plaguicides organoclorats [24], carbamats, triazines, bifenils policlorats (PCBs) i hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) [25,26], compostos organometal·lics [27] i productes farmacèutics i naturals [22].

Un altre mètode instrumental aplicat a l'extracció de fenols en sòls és l'**extracció amb solvents accelerada** (ASE) o també coneguda com extracció amb fluids pressuritzats (PFE). Aquesta metodologia utilitza la combinació de pressió i temperatura per extreure anàlits, de forma ràpida i eficaç, de mostres sòlides. L'augment de la temperatura permet debilitar les interaccions existents entre els anàlits a extreure i els punts actius de la matriu sòlida i disminueix la viscositat i la tensió superficial dels solvents utilitzats de manera que s'afavoreix la penetració del solvent dins el sòlid. Amb un augment de la pressió, s'aconsegueix que els extractants utilitzats es mantinguin en forma líquida per sobre del seu punt d'ebullició. Alguns dels solvents utilitzats en l'ASE de compostos fenòlics són acetonitril [28], aigua, ja sigui sola [29] o combinada amb modificadors orgànics com acetonitril [30], mescles acetona-metanol (1:1 v/v) [31], diclorometà [6] o hexà [32]. En aquest últim cas, la incorporació de modificadors orgànics tal com metanol o acetona fa que augmenti la solubilitat dels compostos més polars i d'aquesta manera es millora l'eficàcia del procés d'extracció.

Un fluid supercrític és una substància que a unes determinades condicions de pressió i temperatura (conegudes com el seu punt crític) adopta un comportament intermedi entre un líquid i un gas. Algunes de les propietats que ofereixen aquests tipus de fluids són un bon poder solvatant, alta difusibilitat, baixa viscositat i una tensió superficial mínima. Degut a totes aquestes característiques, els fluids supercrítics són uns bons extractants per a compostos orgànics. El diòxid de carboni resulta ser un dels solvents més adequats per aplicar la tècnica d'**extracció amb fluids supercrítics** (SFE) degut a que les seves condicions supercrítics són simples d'assolir (74.8 atm i 31.1°C) [7], és químicament inert i no és tòxic ni explosiu. En el seu estat supercrític té unes característiques similars a les del pentà, pel que resulta ser adient per a l'extracció d'anàlits poc polars. S'ha aplicat també a l'extracció de compostos fenòlics de mostres de sòl [33] essent necessària en aquest cas l'addició d'un modificador orgànic (metanol) per aconseguir una mescla capaç de donar lloc a extraccions més eficaçes per als derivats més polars. Altres solvents que es poden utilitzar per a la SFE de compostos orgànics són amoníac, metanol, òxid nítrós o fins i tot aigua, encara que els valors de pressió i temperatura que s'han d'assolir en alguns casos es troben molt per sobre dels que s'utilitzen amb CO₂. En l'extracció amb fluids supercrítics es pot operar en condicions estàtiques, quan la mostra i solvent es barregen i es deixen en repòs, o dinàmiques, quan és el fluid supercrític

el que circula contínuament a través de la mostra. El seu avantatge principal és que és una tècnica molt neta perquè el CO₂ s'elimina fàcilment i no s'introdueix cap altra substància contaminant, però requereix d'un equipament especial i costós.

L'**extracció mitjançant purga i atrapament** (*purge and trap*) és una tècnica àmpliament usada en l'extracció de compostos orgànics volàtils presents en mostres aquoses. També és aplicable a l'anàlisi de mostres sòlides, concretament Zuloaga et al. [34] l'han utilitzat per a l'anàlisi de compostos fenòlics en mostres de sòl fortificat. L'extracció té lloc en dos passos, la volatilització dels anàlits a l'espai en cap del recipient que conté la mostra, seguida d'una purga i arrossegament dels anàlits amb un corrent de gas inert que els transporta fins a una trampa (*trap*) que els adsorbeix. Finalment, els compostos són desorbitats tèrmicament i enviats directament al port d'injecció d'un cromatògraf de gasos.

Una altra tècnica que té més aplicació per a l'anàlisi d'aigües però que s'ha utilitzat per a l'extracció de sòls és la **microextracció en fase sòlida** (SPME). És, principalment, un mètode de preconcentració de matrius líquides tal com hem vist en el **capítol 1** (apartat 1.3.2) i consisteix en un procés de partició dels anàlits entre la mostra i una fase estacionària que es pot submergir en la mostra o posar en contacte amb l'espai en cap del recipient que la conté, en el cas de l'anàlisi de substàncies volàtils. Quan s'aplica la SPME al monitoratge de mostres sòlides es poden seguir dos esquemes de treball, tal com presenten Sarrión et al. [35] per a l'anàlisi de clorobenzens: extracció directa del sòl per exposició de la fibra a l'espai en cap o extracció d'una suspensió sòl-aigua on es submergeix la fibra. La tècnica de microextracció en fase sòlida també s'ha aplicat per a l'extracció de fenols en sòls [36,37].

Per últim, potser una de les tècniques d'anàlisi de sòls més innovadores és la que rep el nom de **dispersió en matriu de fase sòlida** (*Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD*). És anàloga a la SPE però aplicada a matrius sòlides. El sòl que conté els anàlits a extreure es mescla amb una certa quantitat d'un sorbent dels utilitzats per a l'extracció en fase sòlida. S'empaqueta una columna amb la mescla sòl-sorbent (recomanat en proporció 1:4) i s'elueix amb un solvent adequat, tal i com es fa en un procés de SPE [7].

Cal considerar que la major part dels mètodes comentats per a l'extracció de matrius sòlides han estat validats per l'Agència de Protecció del Medi Ambient dels Estats Units. La **Taula 4.1** mostra un recull de les metodologies oficials actuals establertes per l'EPA per a l'anàlisi de mostres sòlides juntament amb algunes de les característiques més rellevants de cada una d'elles.

| mètode EPA | tècnica extracció | aplicació (*) | temps extracció | consum dissolvent /extracció | cost equipament | nivell automatització |
|------------|-------------------|--|----------------------|------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 3540 | soxhlet | compostos orgànics no volàtils i semivolàtils | 8-24 hores | 150-300 mL | baix | mínim |
| 3541 | soxtec | bifenils policlorats, plaguicides organoclorats i compostos semivolàtils | 2-4 hores | 40-50 mL | baix-moderat | mínim |
| 3545 | ASE | compostos orgànics no volàtils i semivolàtils | aprox. 12 min. | 25 mL | alt | completament automatitzat |
| 3550 | ultrasons | compostos orgànics no volàtils i semivolàtils | 5-15 min. (3-4 cops) | 50-100 mL | baix-moderat | mínim |
| 3560 | SFE | hidrocarburs semivolàtils del petroli | 30 min.–1 hora | 10-20 mL | alt | de mínim a alt |
| 3561 | SFE | hidrocarburs aromàtics policíclics | | | | |
| 3562 | SFE | bifenils policlorats i plaguicides organoclorats (**) | | | | |

(*) compostos presents en sòls, fangs relativament secs i residus sòlids.

(**) compostos presents en sediments, cendres i altres matrius sòlides sensibles a l'extracció amb solvents convencionals (a més de sòls, fangs relativament secs i residus sòlids)

Taula 4.1 Mètodes oficials de l'EPA per a l'extracció de matrius sòlides.

4.1.2 Interferències associades a l'extracció de sòls

Un dels principals problemes de la majoria de mètodes d'extracció de sòls és que es porten a terme en condicions experimentals molt agressives i això provoca que, en general, s'extreguin un nombre gran de compostos i els mètodes no són gaire selectius. Aquest fet,

l·ligat a que els sòls presenten una composició molt heterogènia, amb moltes substàncies susceptibles a ser extretes amb els solvents, condiciona que els extractes obtinguts siguin complexos i que els anàlits d'interès difícilment es puguin quantificar sense un pas previ d'eliminació d'interferències. Aquesta etapa de purificació (*clean-up*) es pot dur a terme simultàniament amb una preconcentració dels anàlits que millora la detecció dels mateixos. El mètode més utilitzat a tal efecte és l'extracció en fase sòlida perquè resulta ser un procediment senzill i que es pot acoblar fàcilment a les tècniques de detecció cromatogràfica, tal com ja hem vist en el **capítol 2** d'aquesta memòria. Altres tècniques utilitzades són l'extracció líquid-líquid i la microextracció en fase sòlida. En alguns casos no s'apliquen tècniques de *clean-up* després de l'extracció del sòl, però degut a que els volums de solvents utilitzats en molts mètodes són elevats és necessari reduir aquest volum per mitjà de mètodes d'evaporació per aconseguir concentrar les substàncies d'interès abans de dur-ne a terme la quantificació. Sota aquestes circumstàncies es corre el risc de tenir pèrdues dels anàlits més volàtils o que es produeixi contaminació o adsorció dels mateixos en el material de vidre emprat.

Per al cas de l'extracció de compostos fenòlics presents en sòls i el seu posterior anàlisi per cromatografia líquida, les principals interferències que poden dificultar la quantificació d'aquests anàlits són constituents de la fracció orgànica del propi sòl. La matèria orgànica del sòl es compon de materials inalterats i altres que no conserven el seu estat original sinó que han patit transformacions per mitjà de processos d'humificació. A la vegada, aquest últim grup es divideix en les substàncies húmiques i les no húmiques. Les substàncies no húmiques són compostos que pertanyen a famílies bioquímiques comunes com carbohidrats, lípids o aminoàcids, mentre que el grup de les substàncies húmiques està format per una sèrie de compostos d'alt pes molecular, acolorits (amb tons que van des del groc fins al negre) i que poden ser extrets del sòl per mitjà de solucions alcalines, sals neutres i dissolvents orgànics. És una mescla de substàncies heterogènia formada, bàsicament, per àcids húmics, àcids fúlvics i humines, les quals presenten diferent solubilitat en funció del medi. Els àcids fúlvics, de coloració groguenca, són solubles en aigua en tot el rang de pH mentre que els àcids húmics precipiten en condicions àcides ($\text{pH} < 2$) i són de color marró fosc. Les humines són negres i insolubles a qualsevol valor de pH [1]. Ateses les condicions de solubilitat de les tres fraccions i donat que realitzarem l'extracció del sòl mitjançant solucions en condicions alcalines, en el nostre cas les substàncies interferents més importants seran els àcids húmics i fúlvics del sòl.

L'estructura d'aquests components del sòl no es coneix amb exactitud, però es sap que es tracta de macromolècules aromàtiques que contenen majoritàriament grups carboxílics i hidroxils fenòlics. Els àcids húmics presenten un major grau de polimerització, majors pesos moleculars, un alt percentatge en contingut en carboni i un menor percentatge en oxigen en relació als àcids fúlvics, els quals, per la seva banda, tenen pesos moleculars més petits i contenen un major percentatge en grups funcionals de naturalesa àcida, concretament carboxílics. Estructures hipotètiques dels àcids húmics i fúlvics proposades per Stevenson i Buffle, respectivament, es poden observar a la **Figura 4.1** i **Figura 4.2**.

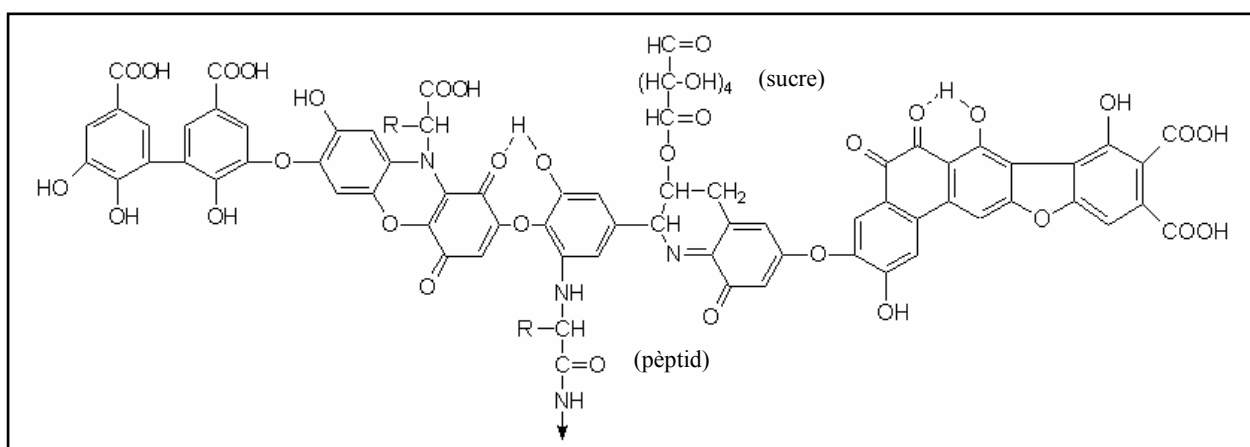


Figura 4.1 Estructura model per als àcids húmics [38]

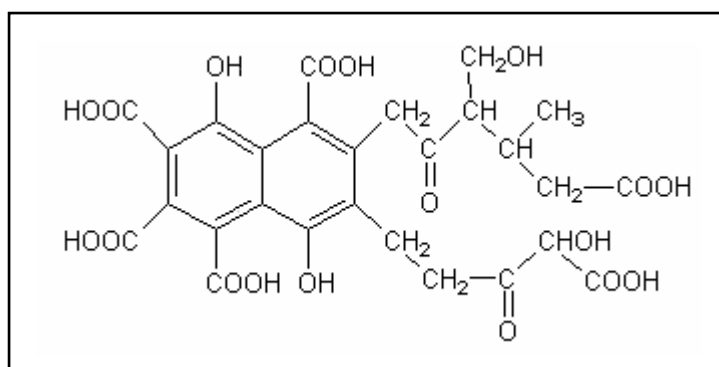


Figura 4.2 Estructura model per als àcids fúlvics [38].

Tal com es pot deduir de la **Figura 4.1**, els àcids húmics poden contenir, a més del que s'ha comentat anteriorment, grups aminoàcid, sucres, pèptids o altres compostos alifàtics enllaçats entre els diferents anells aromàtics. Tot i que els àcids fúlvics són els que més fàcilment es degraden, la seva vida mitja s'estima entre 10 i 50 anys. El temps de vida mitja

dels àcids húmics es mesura, generalment, en segles. Aquesta gran resistència a la degradació provoca que aquests materials romanguin inalterats en el sòl per llarg temps i que, en aplicar processos d'extracció sobre el mateix, es coextreguin juntament amb els anàlits d'interès, causant importants problemes d'interferències. Quan la detecció dels compostos d'interès té lloc per cromatografia líquida, la presència d'aquests constituents del sòl provoca l'aparició d'una gran banda a l'inici dels cromatogrames que dificulta la quantificació dels anàlits més polars, tal com veurem més endavant a l'apartat de resultats i discussió.

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Reactius

- 4-cloro-3-metilfenol: sòlid, 99.5%, ref. C11440300, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2-clorofenol: líquid, 99.5%, ref. C11470000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-diclorofenol: sòlid, 99.5%, ref. C12451000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-dinitrofenol: sòlid, 83.5%, ref. C12785000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-dimetilfenol: líquid, 98%, ref. C12731000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2-nitrofenol: sòlid, 98.5%, ref. C155902, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 4-nitrofenol: sòlid, 99%, ref. C15590400, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- Fenol: sòlid, 99.5%, ref. C16025000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4,6-triclorofenol: sòlid, 97%, ref. 91340, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Pentaclorofenol: sòlid, 98%, ref. P260-4, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- 2-metil-4,6-dinitrofenol: sòlid, 90%, ref. C13050000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- Àcid clorhídric (HCl): líquid, p.a. 37%, ref. 30721, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich GmbH (Gilligham-Dorset, Regne Unit).
- Àcid acètic (CH₃COOH): líquid, 99.7% ACS reagent, ref. 32009-9, Aldrich (Steinheim, Alemanya).
- Acetonitril (CH₃CN): líquid, RS-PLUS per HPLC >99.9%, ref. 412392, Carlo Erba (Rodano, Itàlia).
- Metanol (CH₃OH): líquid, RS-PLUS per HPLC 99.9%, ref. 412383, Carlo Erba (Rodano, Itàlia).
- Acetona (CH₃COCH₃): líquid, RS reactiu per a l'anàlisi de residus de pesticides 99.8%, ref. 401022, Carlo Erba (Rodano, Itàlia).

- Hexà (C_6H_6): líquid, RS reactiu per a l'anàlisi de residus de pesticides 98%, ref. 446963, Carlo Erba (Rodano, Itàlia).
- Hidròxid de sodi (NaOH): lleties, reactiu per anàlisi-ACS-ISO 98%, ref. 131687, Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanya).
- Sulfat sòdic anhidre (Na_2SO_4): pols, reactiu (PAR) PAI 99.5%, ref. 325709.1611, Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanya).
- Sòl de Referència Certificat ref. CRM112-100, LGC Promochem (Teddington, Regne Unit).
- Dicromat de potassi ($K_2Cr_2O_7$): sòlid, reactiu puríssim 99%, ref. 141500, Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanya).
- Àcid sulfúric (H_2SO_4): líquid, reactiu químicament pur 96%, ref. 211058, Panreac Química (Barcelona, Espanya).
- Sal de Mohr [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$]: sòlid, ref. 092320, Probus (Barcelona, Espanya).
- Àcid fosfòric (H_3PO_4): líquid, reactiu puríssim 85%, ref. 111032, Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanya).
- Indicador ferroïna preparat a partir de *o*-fenantrolina (reactiu per anàlisi, ref. 1971, F.E.R.O.S.A., Barcelona, Espanya) i sulfat de ferro (II) heptahidratat (reactiu ACS $\geq 99\%$ ref. 7782-63-0, Sigma-Aldrich GmbH, Gilligham-Dorset, Regne Unit).

Es preparen dissolucions estoc de cadascun dels compostos fenòlics individuals en metanol i acetonitril de concentració aproximada $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir dels estocs en acetonitril es preparen dues solucions intermèdies, una que conté tots els anàlits excepte 2-metil-4,6-dinitrofenol i una altra que només conté aquesta última substància de concentració 50 o $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Els patrons de calibratge, de concentració en un rang adient per a cada cas, es preparen per dilució de les solucions intermèdies amb acetonitril. Per altra banda, les solucions de fortificació del sòl sempre contenen els 11 compostos fenòlics objecte d'estudi i es preparen en metanol. Totes les solucions es conserven a $4\text{-}5^\circ\text{C}$.

4.2.2 Aparells i material

- Cromatògraf líquid Spectra System de Thermofinnigan (San Jose, CA, Estats Units) equipat amb una vàlvula d'injecció Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, Estats Units)

amb un *loop* de 20 µL, bomba peristàltica P2000, sistema de desgasificació SCM1000, controlador SN4000 i detector UV-Vis de diodes en línia. Per dur a terme la separació dels anàlits s'utilitza una columna cromatogràfica Kromasil 100 C18 de 5µm de mida de partícula i 20cm×0.46cm i.d. (ref. TR-011942) amb una precolumna de tipus ODS (ref. TR-C-160-1), ambdues de Teknokroma (Barcelona, Espanya).

- Bomba peristàltica Minipuls3 model M312, Gilson (Villiers, França).
- pHmetre GLP22, Crison (Barcelona, Espanya).
- Ultrasons Pselecta (Abrera, Espanya) per desgasificar les fases mòbils.
- Balança analítica electrònica A200S amb una precisió de ± 0.1 mg, Sartorius Analytic (Göttingen, Alemanya).
- Agitador rotatori ROTARY MIXER, DINKO Instruments (Barcelona, Espanya).
- Centrífuga Mixtasel, Pselecta (Abrera, Espanya).
- Rotavapor RE100B, Bibby (Nemours Cedex, França).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de 47 mm i 0.45 µm de mida de porus, ref. 7404-004, Whatman (Maidstone, Anglaterra).
- Xeringues per a HPLC de 100 µL, Hamilton (Bonaduz, Suïssa).
- Adaptador per a cartutx PTFE Isolute (1, 3, 6 mL) ref. 120-1100, International Sorbent Technology LTD (Hengoed, Regne Unit).
- Filtre de membrana d'acetat de cel·lulosa de 47 mm i 0.45 µm de mida de porus, ref. 7184-004, Whatman (Maidstone, Anglaterra).
- Tamís molecular de 2 mm de llum, ref. 013148.4, Cisa (Barcelona, Espanya).
- Llana de vidre per a l'anàlisi de plaguicides, ref. n° 20409, Supelco (Bellefonte, Estats Units).
- Cartutx Bakerbond SDB-1 de 200mg i 3mL de capacitat, J.T. Baker (Deventer, Holanda).

4.2.3 Procediment experimental

4.2.3.1 Anàlisi dels compostos fenòlics

Els compostos fenòlics estudiats són els 11 fenols considerats com a contaminants prioritaris per l'Agència de Protecció del Medi Ambient dels Estats Units, les propietats dels quals s'han resumit al **capítol 2** (apartat 2.1.6). Aquests compostos s'han analitzat mitjançant

cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detecció UV-Vis. El mètode desenvolupat s'ha descrit i caracteritzat àmpliament en el **capítol 2**.

4.2.3.2 Mostres de sòl

El sòl utilitzat en els estudis de caracterització del mètode d'extracció és un sòl superficial d'una zona de pastura de Girona. El sòl, un cop recollit, es neteja de fulles i fraccions grolleres, s'estén sobre un paper de filtre i es deixa assecar a temperatura ambient. Un cop sec, es tamisa a una mida de partícula inferior o igual a 2 mm per aconseguir que sigui homogeni.

La caracterització del mètode d'extracció s'ha dut a terme mitjançant la utilització de mostres de sòl fortificades seguint dues metodologies diferents que es coneixen amb el nom de *spot spiking* i *slurry spiking* [5]. El primer cas, *spot spiking*, consisteix en afegir un petit volum de solució de fortificació a una massa relativament gran de sòl (en comparació amb el volum de líquid). La mescla s'homogeneïtza i l'extracció té lloc immediatament després de la fortificació. A la segona metodologia (*slurry spiking*), s'utilitza una massa concreta de sòl, la qual es posa en contacte amb un volum equivalent de solució de fortificació (e.g., 10 grams de sòl amb 10 mL de solució). En aquest cas és necessari que el solvent s'evapori abans de realitzar l'extracció del sòl, fet que comporta que la mescla sòl-solució es mantingui a temperatura ambient durant un temps que varia en funció del volum de líquid afegit. Tal com veurem més endavant, totes dues tècniques tenen avantatges i inconvenients.

Per a realitzar una part de la validació del mètode s'ha utilitzat un sòl de referència certificat ja contaminat amb alguns dels fenols objecte d'estudi. En aquest cas no ha estat necessari realitzar cap tractament sobre el sòl abans de la seva extracció.

4.2.3.3 Extracció del sòl

4.2.3.3.1 Extracció alcalina

El mètode proposat per a l'extracció de compostos fenòlics utilitza el contacte del sòl amb una solució alcalina per tal d'extreure aquests anàlits en la seva forma fenolat. Per realitzar l'extracció alcalina, es posen en contacte porcions d'1-10 grams de sòl amb volums de 10 o 20 mL de solució d'hidròxid de sodi 0.1M i es manté la mescla en agitació durant 30 minuts. Passat aquest temps, la barreja es filtra a través d'una membrana d'acetat de cel·lulosa

de 0.45 µm de mida de porus i l'extracte obtingut s'ajusta al pH adient en cada cas mitjançant l'addició d'àcid clorhídric diluït.

4.2.3.3.2 Extracció Soxhlet

L'extracció soxhlet s'ha dut a terme seguint el procediment descrit en el mètode 3540 de la EPA. Es mesclen 10 grams de sòl fortificat amb 10 grams de sulfat sòdic anhidre i, després d'homogeneïtzar la mescla, aquesta es col·loca en el recipient adaptat per a la mostra de l'aparell de soxhlet el fons del qual es recobreix prèviament amb llana de vidre. L'extracció té lloc a reflux amb 300 mL d'una mescla hexà/acetona (1:1, v/v) durant 24 hores. Un cop passat aquest temps, es deixa refredar la mescla, es filtra a través de paper de filtre i es rotavapora a sequedat. El residu es redissol amb acetonitril i s'arrasa a un volum final de 3 mL i aquesta solució final s'analitza mitjançant el mètode de cromatografia líquida descrit anteriorment.

4.2.3.4 Preconcentració dels extractes per SPE

Als extractes derivats del mètode d'extracció en condicions alcalines se'ls aplica una etapa de *clean-up* i preconcentració mitjançant SPE. El sorbent utilitzat per retenir els compostos fenòlics és una fase polimèrica comercial de poliestirè-divinilbenzè, Bakerbond SDB-1. El procediment experimental inclou fonamentalment quatre etapes: (1) condicionament de la fase sòlida amb 2 mL d'acetonitril, 2 mL de metanol i 2 mL d'aigua bidestil·lada ajustada amb àcid clorhídric al mateix pH dels extractes; (2) càrrega de la mostra amb els anàlits a 5 mL·min⁻¹ amb ajuda d'una bomba peristàltica; (3) rentat de la fase amb 2 mL d'aigua bidestil·lada igual que la utilitzada en el condicionament i assecat de la mateixa, deixant passar aire durant cinc minuts per eliminar les restes de solució dels intersticis i (4) elució dels anàlits adsorbits a la fase sòlida amb diferents porcions d'1 mL d'acetonitril per gravetat, les quals s'analitzen amb el mètode de cromatografia líquida descrit.

4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest capítol es descriu una metodologia per determinar els compostos fenòlics considerats com a contaminants prioritaris per la EPA presents en mostres de sòls mitjançant extracció per agitació de la mostra amb una solució alcalina, posterior *clean-up* i preconcentració per extracció en fase sòlida amb un sorbent polimèric i detecció per cromatografia líquida acoblada a un detector de díodes en línia.

4.3.1 Caracterització del sòl

El sòl utilitzat per tal de dur a terme les proves de caracterització del mètode d'extracció proposat és un sòl mostrejat a l'Alt Empordà (Girona). Es tracta d'un sòl de textura argilosa al tacte, d'estructura prismàtica o columnar en sec i amb activitat biològica abundant, compacte, plàstic i adherent. Algunes de les seves propietats químiques es resumeixen a la **Taula 4.2**.

| paràmetre | unitats | valor |
|--------------------------|----------|-------|
| argila | % | 52.35 |
| l·lim | % | 39.85 |
| sorres | % | 7.80 |
| pH | | 6.95 |
| Conductivitat elèctrica | dS/m | 2.40 |
| carbonats | % | 6.75 |
| Matèria orgànica | % | 6.70 |
| Capacitat canvi catiònic | meq/100g | 63.70 |
| Ca de canvi | meq/100g | 49.90 |
| Mg | meq/100g | 10.64 |
| K | meq/100g | 3.32 |
| Na | meq/100g | 2.50 |

Taula 4.2 Caracterització analítica del sòl estudiat.

Destaca el seu elevat contingut en matèria orgànica (6.7%), el qual pot ser indicatiu de fraccions importants d'àcids húmics i fúlvics que es poden extreure juntament amb els compostos fenòlics d'interès i causar-nos greus problemes d'interferències en la quantificació d'aquests anàlits.

4.3.2 Caracterització del mètode

4.3.2.1 Avaluació de l'etapa d'extracció

En aquesta memòria s'estudia l'extracció de compostos fenòlics per contacte del sòl amb una solució alcalina aprofitant les propietats àcid-base que tenen aquestes substàncies i que fan que s'extreguin fàcilment en la seva forma fenolat (forma aniònica). L'extracció de fenols en aquestes condicions és ràpida degut a la gran afinitat dels ions fenolat per la fase líquida. S'han assajat diferents temps de contacte del sòl amb una solució alcalina d'hidròxid sòdic 0.1M per tal d'avaluar la cinètica del procés i trobar les condicions òptimes d'extracció (30 min, 3 h, 5 h i 8 h). En tots els casos s'ha obtingut la mateixa eficàcia del procés el que indica que la cinètica d'extracció és ràpida. Per tant, els experiments es duran a terme amb un temps de contacte de 30 min. Un estudi anterior al nostre grup de recerca va comprovar que l'augment de la concentració d'hidròxid sòdic per sobre de 0.1 M no condueix a millores significatives en les recuperacions de compostos fenòlics però suposa un augment en les quantitats d'àcids húmics i fúlvics coextrets [39]. Per altra banda, la realització d'una segona etapa d'extracció alcalina del sòl no es tradueix en una millora significativa de les recuperacions obtingudes.

Com es pot observar pels resultats obtinguts, una única extracció del sòl amb una solució d'hidròxid sòdic 0.1M durant 30 minuts proporciona resultats adients en la recuperació dels compostos fenòlics, tot i que en altres treballs es reporta l'ús de condicions més dràstiques [9,40,41]. L'extracció alcalina té com a avantatges que és simple, ràpida i precisa d'instrumentació senzilla.

4.3.2.2 Avaluació de l'etapa de *clean-up*

L'extracció dels anàlits del sòl en condicions alcalines provoca que els àcids húmics i fúlvics presents siguin coextrets juntament amb els anàlits. Tal com ja s'ha comentat, aquest fet provoca greus problemes en la detecció i quantificació cromatogràfica si no es duu a terme una etapa prèvia de *clean-up* per eliminar aquestes substàncies. En el nostre cas, s'ha aplicat un procés d'extracció en fase sòlida amb un sorbent polimèric de poliestirè-divinilbenzè d'elevada àrea superficial, l'estructura i característiques del qual es resumeixen a la **Figura 4.3**.

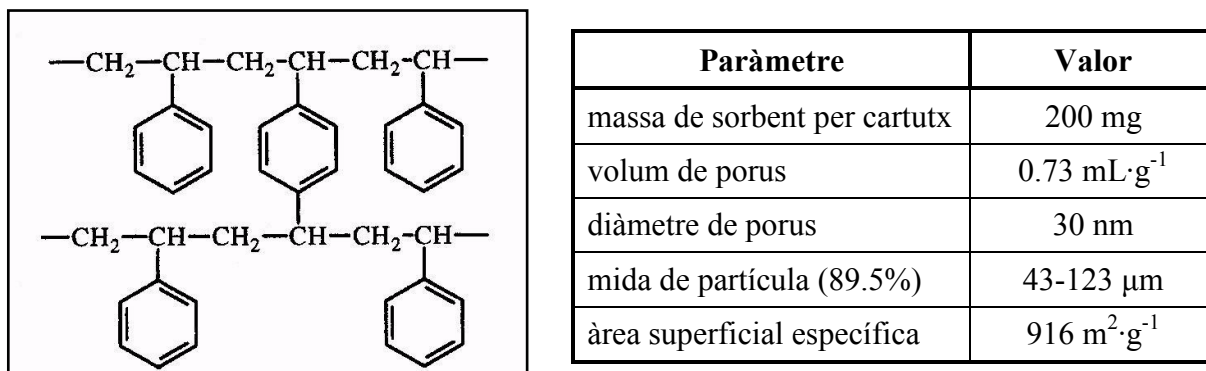


Figura 4.3 Estructura d'una matriu de poliestirè-divinilbenzè i propietats físiques del sorbent Bakerbond SDB-1.

Per avaluar l'eficàcia del *clean-up* aconseguit amb el cartutx Bakerbond SDB-1 s'ha preparat un blanc utilitzant un gram de sòl lliure de compostos fenòlics, el qual s'ha extret amb 10 mL d'hidròxid sòdic 0.1M en les condicions descrites. La **Figura 4.4** compara els cromatogrames obtinguts per a l'extracte analitzat abans i després de dur-ne a terme el *clean-up*.

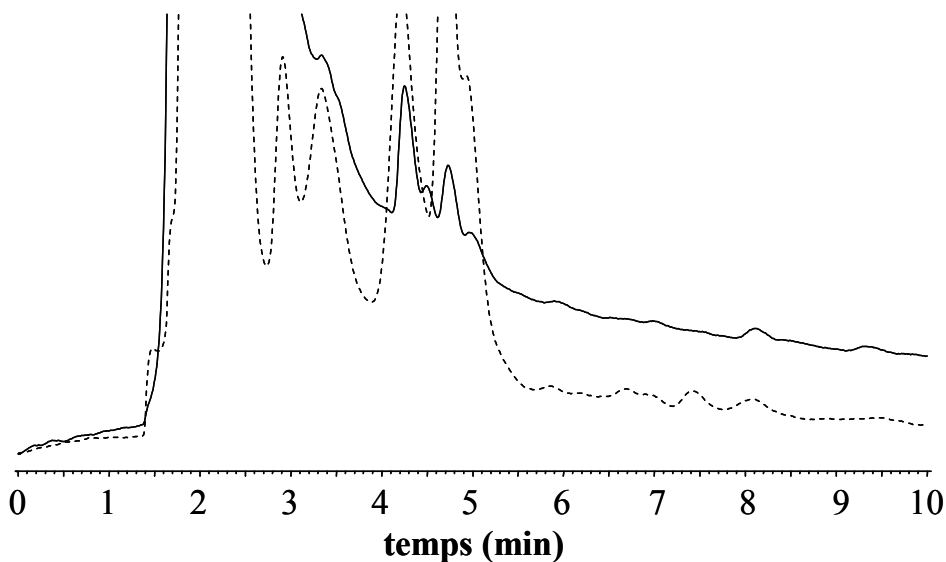


Figura 4.4 Cromatogrames obtinguts per a un extracte lliure de compostos fenòlics analitzat abans (línia contínua) i després (línia discontinua) del seu pas pel sorbent de poliestirè-divinilbenzè avaluat.

Tal com es pot veure a la **Figura 4.4**, després de passar l'extracte pel sorbent polimèric s'ha eliminat part de la banda corresponent a les substàncies húmiques que apareix a l'inici del cromatograma. Encara que no s'eliminen totalment les substàncies fúlviques, la línia base del cromatograma es recupera a partir d'uns 5.5 minuts, el que permet analitzar sense problema tots els compostos d'interès, ja que el primer d'ells apareix a uns 7.5 minuts. L'etapa de SPE dels extractes aconseguix, a més d'un *clean-up*, una concentració dels anàlits atenent que el volum de mostra que es passa pel cartutx (de 10 a 20 mL) es recupera en només 2-3 mL del solvent d'elució.

El següent pas fou avaluar el comportament de la fase sòlida en la preconcentració d'extractes de sòl a diferents valors de pH. Per a cada un d'aquests experiments s'han utilitzat 20 mL d'extracte de sòl net, fortificats posteriorment amb els compostos fenòlics estudiats a un nivell d'1 mg·L⁻¹. Els extractes s'han ajustat a pHs compresos entre 2 i 12 unitats (per als experiments a pH=12 no es requereix d'ajust, s'utilitza l'extracte directament després de l'extracció alcalina del sòl) i s'han concentrat amb el sorbent polimèric. La **Taula 4.3** mostra les recuperacions obtingudes en aquest estudi.

| | pH=2 | pH=4 | pH=6 | pH=8 | pH=10 | pH=12 |
|----------------|---------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| 4C3MP | 103 ± 6 | 101 ± 2 | 99.0 ± 0.7 | 99 ± 2 | 100 ± 5 | 89 ± 8 |
| 24DCP | 104 ± 3 | 97 ± 8 | 96 ± 1 | 90 ± 13 | n.d. | 93 ± 5 |
| 2CP | 78 ± 2 | n.d. | 79 ± 4 | 76 ± 7 | 58 ± 16 | 5 ± 2 |
| 24DMP | 103 ± 4 | 101.8 ± 0.7 | 102 ± 1 | 102 ± 2 | 102 ± 2 | 100.2 ± 0.4 |
| 24DNP | 94 ± 3 | n.d. | 89.3 ± 0.9 | 92 ± 4 | 91 ± 3 | 99 ± 2 |
| 2M46DNP | 105 ± 3 | n.d. | 101.5 ± 0.4 | 102.6 ± 0.3 | 103 ± 3 | 102 ± 3 |
| 2NP | 106 ± 4 | 104.2 ± 0.6 | 101 ± 1 | 70 ± 6 | 78 ± 7 | 19 ± 4 |
| 4NP | 108 ± 4 | 100 ± 5 | 96 ± 7 | 86 ± 5 | 83 ± 6 | 56 ± 6 |
| PCP | 101 ± 5 | n.d. | n.d. | 107 ± 9 | 96 ± 17 | 96 ± 4 |
| Ph | 108 ± 9 | 102 ± 1 | 104 ± 2 | 104 ± 2 | 104 ± 1 | 10 ± 2 |
| 246TCP | 103 ± 4 | 98 ± 3 | 96.4 ± 0.9 | n.d. | 91 ± 2 | 88 ± 4 |

n.d. anàlit no determinat en aquestes condicions

Taula 4.3 Recuperacions obtingudes (n=3) en passar a través del cartutx SDB-1 diferents alíquotes de 20 mL d'extracte de sòl, fortificat a un nivell d'1 mg·L⁻¹ i a diferents pHs.

L'anàlisi estadística de les dades obtingudes mostra que tots els compostos són recuperats quantitativament sense diferències estadísticament significatives a pHs àcids i neutres (amb valors de P que van des de 0.05 per a Ph fins a 0.90 per a 24DMP). En condicions alcalines, per contra, les recuperacions aconseguides no són quantitatives per a tots els anàlits. Els compostos fenòlics estudiats es poden agrupar en quatre blocs en funció del rang de pH en que poden ser preconcentrats en el sorbent. Hi ha un primer grup de quatre compostos que no mostren diferències estadísticament significatives en tot el rang de pH avaluat, fins a pH=12 (24DCP, P=0.29; 24DMP, P=0.86; 24DNP, P=0.87 i 2M46DNP, P=0.63). Un segon grup de dos anàlits mostra els mateixos resultats fins a pH=10 (4C3MP, P=0.59 i Ph, P=0.05). Les recuperacions del 2CP, per la seva banda, són significativament iguals fins a pH=8 (P=0.70). Els darrers tres compostos, 2NP (P=0.11), 4NP (P=0.09) i 246TCP (P=0.08) només són recuperats quantitativament en condicions àcides i neutres. Els resultats per a PCP no s'han inclòs en aquesta anàlisi estadística ja que aquest compost presenta un límit de detecció elevat ($0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el mètode de cromatografia líquida utilitzat fet que provoca que, en alguns casos, la reproductibilitat a la concentració de treball no sigui bona. Així, per no obtenir una anàlisi estadística incorrecta, s'han obviat els resultats per a aquest compost. La conclusió que es pot extreure d'aquest estudi és que és necessària la neutralització dels extractes abans de dur a terme el procés SPE però que no és precís acidificar-los fins a pH 2-3 tal com passa per a altres tipus de sorbents (e.g., les fases C₁₈). L'acidificació dels extractes a valors baixos de pH provoca la precipitació de les substàncies húmiques i fúlviques coextretes que es troben en elevades quantitats degut a l'alt contingut en matèria orgànica del sòl avaluat. La formació d'aquest precipitat pot causar adsorció irreversible d'alguns dels fenols en ell i, en conseqüència, pèrdues en les seves recuperacions i també un augment en l'error de determinació. L'ús del sorbent de poliestirè-divinilbenzè Bakerbond SDB-1 evita els possibles problemes de pèrdua dels anàlits per adsorció ja que no precisa de valors de pH molt àcids i per tant no té lloc precipitació de les substàncies húmiques.

Si es comparen els comportaments observats per als compostos fenòlics amb els seus valors de pK_a podem comprovar que no és condició indispensable tenir els anàlits en forma neutra per obtenir recuperacions quantitatives amb aquest tipus de sorbents. Un exemple clar és el 24DNP, el qual, tot i tenir un pK_a de 4.04, proporciona bones recuperacions fins i tot quan es preconcentra a pH=12 (condicions en que es troba totalment ionitzat). Així doncs, el sorbent avaluat també difereix d'altres fases sòlides estudiades en les que disposar dels anàlits

a preconcentrar en forma neutra és totalment necessari. Aquest fet es pot explicar tenint en compte que el mecanisme principal d'adsorció en les matrius de poliestirè-divinilbenzè són interaccions hidrofòbiques de tipus π - π entre els anells aromàtics dels compostos fenòlics i les parts aromàtiques del sorbent.

4.3.2.3 Efecte de la concentració i la massa de sòl

Per tal d'estudiar l'efecte de la concentració dels anàlits en el sòl en la seva extracció amb el mètode proposat s'han fortificat porcions d'un gram de sòl a tres concentracions diferents, 1, 10 i 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, les quals s'han sotmès a l'extracció amb 10 mL d'hidròxid sòdic 0.1 M i posterior *clean-up* amb el cartutx Bakerbond SDB-1. Les recuperacions obtingudes per a 3 replicats en cada cas es mostren a la **Taula 4.4**

| | 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | | 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | | 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | |
|----------------|---|----------------|--|----------------|--|----------------|
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) |
| 4C3MP | 86 | 3 | 96 | 2 | 93 | 3 |
| 24DCP | 92 | 2 | 107 | 5 | 97 | 5 |
| 2CP | 116 | 5 | 96.3 | 0.8 | 122 | 2 |
| 24DMP | 79 | 1 | 95 | 1 | 94 | 2 |
| 24DNP | 94 | 2 | 94 | 8 | 90 | 12 |
| 2M46DNP | 100 | 2 | 109 | 2 | 100 | 2 |
| 2NP | 99 | 3 | 95 | 1 | 96 | 2 |
| 4NP | 100 | 3 | 106 | 1 | 101 | 3 |
| PCP | < LOD | -- | 101 | 1 | 80 | 10 |
| Ph | 112 | 3 | 96 | 2 | 96 | 2 |
| 246TCP | 97 | 1 | 101 | 2 | 98 | 5 |

LOD: límit de detecció del mètode d'anàlisi

Taula 4.4 Valors mitjans (n=3) de les recuperacions obtingudes en l'extracció d'1 gram de sòl fortificat amb *spot spiking* a tres nivells de concentració. Elució del sorbent amb 3 mL d'acetonitril.

L'elevat límit de detecció del pentaclorofenol no permet obtenir resultats per a aquest compost al nivell de concentració més baix estudiat (1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Exceptuant aquest compost, l'anàlisi estadística del conjunt de dades obtingudes mostra que no existeixen diferències estadísticament significatives entre les recuperacions aconseguides als tres nivells de

concentració avaluats ($P=0.14$). Això vol dir que ni al nivell més alt de concentració s'ha saturat la fase sòlida.

A la **Taula 4.5** podem veure l'efecte de la quantitat de sòl utilitzada per a l'anàlisi. Diferents porcions d'1, 5 i 10 grams de sòl s'han fortificat a un nivell d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ per a cada un dels compostos fenòlics mitjançant *spot spiking* i s'han extret seguint les condicions del mètode proposat (masses d'1 i 5 grams s'han extret amb 10 mL de NaOH 0.1 M i masses de 10 grams s'han extret amb 20 mL de NaOH 0.1 M).

| | 1 gram | | 5 grams | | 10 grams | |
|----------------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|
| | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) | R (%) | RSD (%) |
| 4C3MP | 86 | 3 | 83 | 2 | 75 | 5 |
| 24DCP | 92 | 2 | 94 | 3 | 89 | 5 |
| 2CP | 116 | 5 | 99 | 1 | 82 | 10 |
| 24DMP | 79 | 1 | 86 | 3 | 83 | 7 |
| 24DNP | 94 | 2 | 73 | 3 | 71 | 3 |
| 2M46DNP | 100 | 2 | 90 | 2 | 90 | 4 |
| 2NP | 99 | 3 | 94 | 2 | 98 | 2 |
| 4NP | 100 | 3 | 98 | 4 | 102 | 4 |
| PCP | < LOD | -- | <LOQ | -- | 93 | 25 |
| Ph | 112 | 3 | 121 | 2 | 128 | 2 |
| 246TCP | 97 | 1 | 96 | 3 | 94 | 2 |

LOD: límit de detecció del mètode d'anàlisi

LOQ: límit de quantificació del mètode d'anàlisi

Taula 4.5 Valors mitjans ($n=3$) de les recuperacions obtingudes en l'extracció de diferents masses de sòl fortificades a un nivell d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Elució del sorbent amb 3 mL d'acetonitril.

De la **Taula 4.5** es dedueix que les recuperacions obtingudes, per norma general, decreixen en augmentar la quantitat de sòl extreta. Aquesta tendència és lògica si considerem que un augment de la massa de sòl comporta un augment de la quantitat de substàncies húmiques coextretes, les quals poden saturar parcialment la fase sòlida i provocar una disminució en la retenció dels anàlits. L'anàlisi estadística de les dades conclou que sí existeixen diferències estadísticament significatives per a un nivell de confiança del 95% ($P<0.05$) entre les recuperacions obtingudes per a les tres masses de sòl. En aquest cas, no ha estat possible detectar el pentaclorofenol en l'anàlisi d'1 gram de sòl i s'ha pogut detectar però no quantificar en treballar amb 5 grams de sòl.

4.3.2.4 Validació del mètode

El mètode d'extracció i preconcentració avaluat s'ha validat seguint dues metodologies diferents. En primer lloc s'ha aplicat el mètode complert a l'anàlisi d'un sòl de referència certificat (CRM112-100) que conté vuit dels onze compostos fenòlics estudiats a nivells de concentració entre 2 i 6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Es tracta d'un sòl contaminat amb fenols que prové d'una planta de tractament de fusta amb un pH de 6.96 i un contingut en matèria orgànica del 1.05 % mesurat per oxidació amb dicromat de potassi en condicions àcides. Els resultats obtinguts en l'extracció i preconcentració d'aquest material es poden veure a la **Taula 4.6**. En ella es recullen les recuperacions dels anàlits en l'elució de la fase sòlida amb acetonitril (condicions habituals) i també amb metanol, els valors de concentració certificats per a cada un dels fenols i els intervals de confiança per a aquest valors.

| | valors certificats ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | interval ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | valors experimentals ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | |
|----------------|---|--|--|---------------|
| | | | acetonitril (n=6) | metanol (n=2) |
| 4C3MP | 4.94 | 3.04-6.84 | 5.4 ± 0.4 | 4.82 ± 0.01 |
| 2CP | 2.38 | 1.35-3.41 | 2.9 ± 0.2 | 2.70 ± 0.06 |
| 24DNP | 0.65 | v.n.c. | 1.3 ± 0.4 | 4.3 ± 0.1 |
| 2M46DNP | 4.75 | 2.35-7.15 | 9.9 ± 0.4 | 8.85 ± 0.07 |
| 2NP | 4.33 | 2.40-6.27 | 7.3 ± 0.2 | 6.9 ± 0.3 |
| 4NP | 5.66 | 2.56-8.76 | 5.8 ± 0.4 | 5.6 ± 0.1 |
| PCP | 5.05 | 2.12-7.98 | 6 ± 1 | 8.1 ± 0.1 |
| Ph | 2.45 | 1.35-3.55 | 2.42 ± 0.04 | 2.21 ± 0.02 |

v.n.c.: valor no certificat

Taula 4.6 Resultats per a l'anàlisi del sòl de referència certificat amb el mètode proposat.

Els valors de desviació estàndard de les concentracions obtingudes experimentalment són baixos, tant per 2 com per 6 replicats, el que demostra que el mètode proposat gaudeix d'una elevada repetibilitat. A la vegada, les concentracions trobades estan en consonància amb els intervals de confiança proporcionats per la casa comercial per al material de referència.

L'eficàcia del mètode també s'ha comparat amb l'obtinguda mitjançant l'aplicació del mètode oficial 3540 de la EPA (*extracció soxhlet*) [42]. Els resultats d'aquesta comparació es poden observar a la **Figura 4.5**.

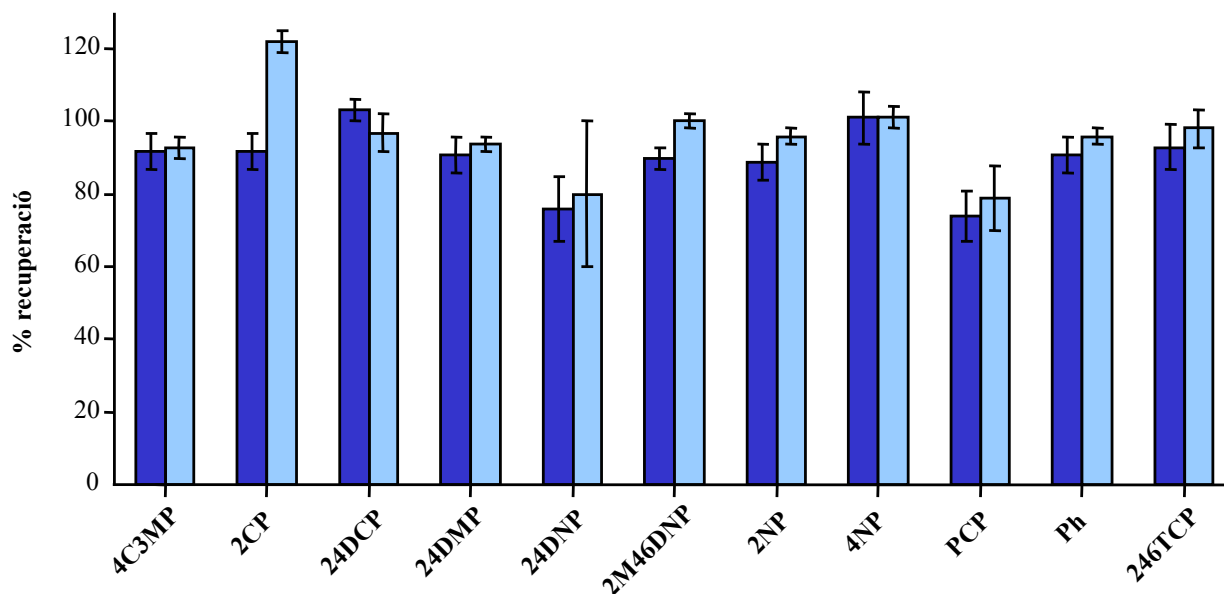


Figura 4.5 Comparació de les recuperacions obtingudes amb el mètode d'extracció estudiat (barres blau clar) i el soxhlet (barres blau fosc) per a $n=3$.

L'anàlisi estadística de les dades obtingudes indica que les recuperacions aconseguides aplicant ambdues metodologies són significativament iguals. Només dos compostos, 2CP i 2M46DNP, mostren diferències estadísticament significatives ($P < 0.05$) entre els resultats dels dos mètodes, però per a tots dos anàlisis les recuperacions obtingudes aplicant el mètode proposat són superiors a les aconseguides amb el mètode oficial.

Dels estudis realitzats es dedueix, doncs, que el mètode d'extracció i concentració de compostos fenòlics estudiat en aquest capítol és apropiat per a la determinació d'aquests contaminants considerats com a prioritaris per la EPA. A més, presenta certs avantatges respecte a altres mètodes d'anàlisi de sòls com la seva rapidesa i senzillesa, utilitza instrumentació assequible per a tot tipus de laboratoris i les condicions d'extracció no són agressives.

Els límits de detecció del mètode de determinació de compostos fenòlics en sòls, incloent totes les etapes de pretractament de la mostra (extracció i SPE) i la d'anàlisi, s'han determinat fortificant diferents porcions de 5 grams de sòl per mitjà de la tècnica *spot spiking*

a diferents nivells de concentració i analitzant els eluats obtinguts segons el mètode proposat. Els valors assolits es troben, en tots els casos excepte per al PCP, a nivells de $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ tal com es pot veure a la **Taula 4.7**.

| compost | límit de detecció ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) |
|----------------|--|
| 4C3MP | 64 |
| 2CP | 22 |
| 24DCP | 18 |
| 24DMP | 30 |
| 24DNP | 20 |
| 2NP | 20 |
| 4NP | 20 |
| PCP | $> 1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ |
| Ph | 22 |
| 246TCP | 65 |
| 2M46DNP | 13 |

Taula 4.7 Límits de detecció del mètode d'extracció i anàlisi de compostos fenòlics en sòls.

Pel que fa al pentaclorofenol, el seu límit de detecció instrumental ($0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) és massa elevat per aconseguir límits de detecció del mètode complert als nivells aconseguits per la resta de compostos.

4.3.2.5 Estudis de degradació de compostos fenòlics

A la secció experimental ja s'ha comentat que estan descrites dues metodologies diferents de fortificació de sòls. Tots els experiments realitzats fins aquest punt s'han dut a terme mitjançant *spot spiking*. En realitat, aquest mètode, al no deixar temps perquè els contaminants interaccionin amb el sòl, no simula les interaccions reals que tenen els anàlits amb els compostos presents al sòl. Amb l'*slurry spiking*, en canvi, les interaccions dels contaminants amb el sòl són més similars a les reals ja que, durant el temps en que es deixa evaporar el solvent de fortificació a temperatura ambient, els anàlits poden crear enllaços més forts amb el sòl. De totes maneres, el sòl és un material molt heterogeni i resulta difícil predir de quina manera trobarem els contaminants enllaçats a ell a l'igual que el tipus d'interaccions seran diferents en cada sòl concret i dependran de les seves propietats físiques i la seva composició química.

En aquest apartat s'han fortificat sòls mitjançant *slurry spiking* per tal d'estudiar els efectes de la composició del sòl en les recuperacions de compostos fenòlics. En un primer bloc d'experiments s'han fortificat diferents porcions de 5 grams de sòl amb 5 mL de solució de fortificació (en metanol) de manera que la concentració final de cada compost en el sòl fos $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Passats cinc dies, en els que es deixa la mescla a temperatura ambient per evaporar totalment el metanol, s'ha extret el sòl en les condicions exposades anteriorment. Els resultats obtinguts es poden veure a la **Taula 4.8**. Els valors per a pentaclorofenol no s'han pogut determinar en aquest cas degut a que el límit de quantificació per a aquest compost es troba per sobre del nivell estudiat.

| | R (%) | RSD (%) |
|----------------|--------------|----------------|
| 4C3MP | 66 | 11 |
| 24DCP | 67 | 11 |
| 2CP | 33 | 14 |
| 24DMP | 43 | 12 |
| 24DNP | 71 | 5 |
| 2M46DNP | 78 | 2 |
| 2NP | 62 | 3 |
| 4NP | 88 | 6 |
| PCP | < LOQ | -- |
| Ph | 67 | 9 |
| 246TCP | 69 | 4 |

LOQ: límit de quantificació

Taula 4.8 Recuperacions obtingudes (n=3) en la fortificació de diferents porcions de 5 grams de sòl mitjançant *slurry spiking*.

Les recuperacions obtingudes en aquest cas resulten ser fins a un 60% inferiors a les que obteníem mitjançant *spot spiking*. Aquests resultats suggereixen que els compostos fenòlics pateixen degradació en el sòl durant l'etapa d'evaporació del solvent.

El segon bloc d'experiments s'ha destinat a estudiar l'evolució d'aquesta degradació al llarg del temps. Per això s'han fortificat dues porcions de 10 grams de sòl amb 10 mL de solució metanòlica de manera que cada un dels compostos fenòlics tingués una concentració d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en el sòl. Després del temps necessari d'evaporació a temperatura ambient (5 dies) s'han analitzat porcions de 2 grams d'aquests sòls segons el mètode proposat. Les

recuperacions obtingudes es recullen a la **Taula 4.9**. Després d'aquesta primera extracció, el sòl que resta d'una de les porcions de 10 grams es guarda a 4°C mentre que l'altre es conserva al congelador (-21°C). Passat un mes, es duu a terme una segona extracció d'aquests sòls en les mateixes condicions que en el primer cas. Els resultats també es recullen a la **Taula 4.9**.

| | Sòl guardat a -21°C | | Sòl guardat a 4°C | |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1 ^a extracció | 2 ^a extracció | 1 ^a extracció | 2 ^a extracció |
| | R (%) | R (%) (n=2) | R (%) | R (%) (n=2) |
| 4C3MP | 78 ± 2 | 74 ± 3 | 72 ± 3 | 57 ± 4 |
| 24DCP | 101 ± 15 | 84 ± 6 | 67 ± 6 | 66 ± 10 |
| 2CP | 50 ± 4 | 31 ± 5 | 60 ± 1 | 2 ± 1 |
| 24DMP | 14 ± 2 | 19 ± 5 | 46.2 ± 0.6 | 2.5 ± 0.5 |
| 24DNP | 71 ± 3 | 74 ± 4 | 72 ± 4 | 69 ± 7 |
| 2M46DNP | 87 ± 2 | 87 ± 2 | 77 ± 2 | 80 ± 9 |
| 2NP | 48 ± 2 | 46 ± 2 | 64 ± 3 | 21 ± 2 |
| 4NP | 92 ± 3 | 89 ± 2 | 78 ± 4 | 89 ± 9 |
| Ph | 43 ± 4 | 48 ± 4 | 63.0 ± 0.2 | 36 ± 2 |
| 246TCP | 89.3 ± 0.9 | 85 ± 3 | 85 ± 6 | 85 ± 4 |

Taula 4.9 Recuperacions obtingudes (n=3) en les proves de degradació de compostos fenòlics en el sòl estudiat (sòl fortificat amb *slurry spiking*).

En el cas de conservar el sòl a 4°C després de la primera extracció, els resultats aconseguits en la segona extracció per a cinc dels compostos (4C3MP, 2CP, 24DMP, 2NP i Ph) són fins a 30 cops inferiors als obtinguts en la primera. Aquest fet indica que la degradació dels compostos fenòlics en el sòl té lloc durant un període de temps llarg i que els resultats que obtindrem en l'anàlisi d'un sòl contaminat amb fenols dependrà del moment en que aquesta es dugui a terme. A més, en el sòl utilitzat en aquest estudi, la conservació a baixa temperatura (4°C) no ajuda a aturar el procés de degradació. Els resultats obtinguts amb el sòl conservat a -21°C no mostren variacions tan elevades entre les recuperacions obtingudes inicialment i després d'un mes de conservació a aquesta temperatura com succeeix amb el sòl conservat a 4°C, excepte pel cas del 2-clorofenol. Aquest fet indica que la conservació de les mostres congelades a baixes temperatures ajuda a frenar la degradació dels compostos fenòlics al sòl. Per tant, a l'hora d'analitzar mostres de sòl contaminat amb aquestes substàncies serà necessari conservar-les congelades si volem mantenir uns nivells de contaminació similars als existents en el moment de la presa de mostra.

Un segon sòl (Celrà) amb un contingut en matèria orgànica inferior (4.2%) a l'estudiat fins ara també ha estat avaluat utilitzant el mètode de *slurry spiking* per poder comprovar la degradació dels compostos en aquest altre sòl (**Taula 4.10**). Els valors de recuperació obtinguts són lleugerament superiors als del sòl amb un contingut superior de matèria orgànica. Aquest fet es pot associar al menor contingut en matèria orgànica d'aquest segon sòl (Celrà). Les dades experimentals mostren que, igual que per al cas del primer sòl, els fenols han patit degradació també en el sòl de Celrà.

| | R (%) | RSD (%) |
|----------------|--------------|----------------|
| 4C3MP | 78.8 | 1.0 |
| 24DCP | 70 | 22 |
| 2CP | 77 | 3 |
| 24DMP | 62 | 2 |
| 24DNP | 59 | 5 |
| 2M46DNP | 75 | 4 |
| 2NP | 84 | 1 |
| 4NP | 88 | 5 |
| PCP | < LOD | --- |
| Ph | 86 | 10 |
| 246TCP | 52 | 14 |

LOD: límit de detecció

Taula 4.10 Recuperacions obtingudes (n=2) en la fortificació de diferents porcions d'1 gram de sòl de Celrà mitjançant *slurry spiking*.

Per tal d'entendre les causes de la degradació dels fenols produïda durant l'etapa de fortificació del sòl ens hem de fixar en els processos que poden patir aquests compostos en aquest medi, els qual es poden veure a la **Figura 4.6**.

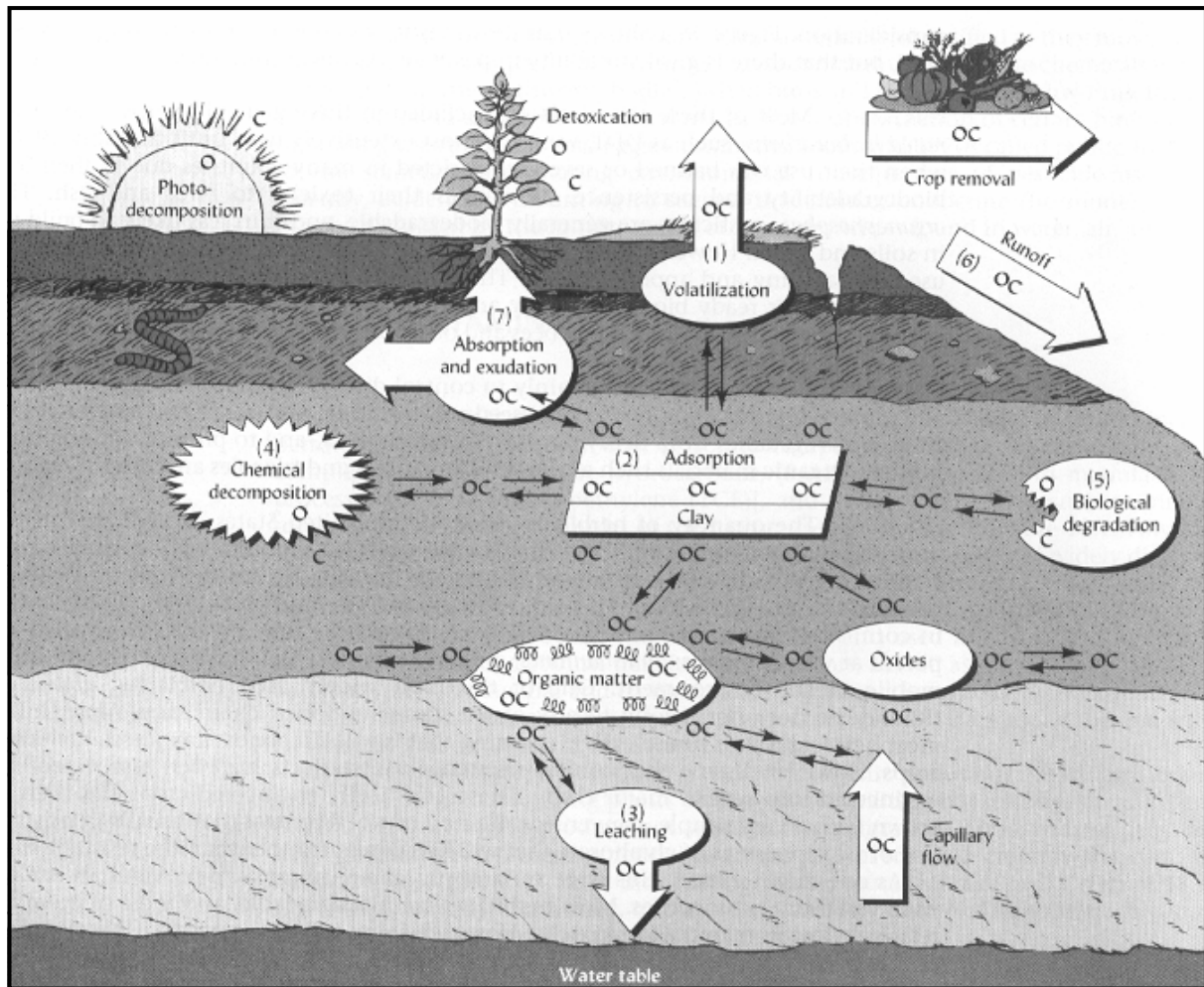


Figura 4.6 Representació dels processos que pot patir un contaminant orgànic (OC, en el dibuix) en el sòl [1].

Un contaminant orgànic abocat en un sòl pot ser transportat, degradat o transformat tot seguint diferents processos que dependran, en gran mesura, de les característiques físiques i químiques del sòl en qüestió. Per al cas que ens ocupa, que és l'estudi de sòls contaminants de forma sintètica al laboratori (fortificats), el nombre de transformacions patides pels compostos fenòlics serà inferior a les que podrien patir en un sòl natural en el qual s'hi haguessin abocat. En el nostre cas no hem de tenir en compte la fotodescomposició, la percolació d'aquestes substàncies a través del sòl i posterior pas als aqüífers o aigües subterrànies o la seva assimilació per part d'espècies vegetals. També és improbable que es produeixi l'evaporació dels compostos a temperatura ambient del laboratori. En canvi, en un sòl fortificat, els fenols poden ser adsorbits irreversiblement per alguns dels seus components, com la matèria orgànica o l'argila, patir degradació química per l'acció d'enzims i òxids metàl·lics o

degradació biològica per la presència de microorganismes [43]. La degradació observada no es pot associar a un sol d'aquests factors sinó que és un cúmul de tots ells. Així, per exemple, s'han realitzat una sèrie d'experiments de fortificació de sòl prèviament esterilitzat en autoclau i els resultats obtinguts han estat similars als que s'han obtingut anteriorment. Això ens indica que la degradació no és únicament deguda a la presència de microorganismes perquè en esterilitzar un sòl el que s'aconsegueix és frenar la seva activitat. També podríem pensar que es pateixen pèrdues dels compostos estudiats per adsorció d'aquests sobre el material de vidre utilitzat, però aquesta suposició queda descartada perquè en els experiments de degradació del primer bloc s'ha dut a terme fortificació i extracció alcalina en el mateix recipient.

Els factors responsables de la disminució de les recuperacions obtingudes per a compostos fenòlics poden ser processos de caràcter físic (adsorció), químic (transformació química) i biològic (degradació microbiològica) que estan íntimament lligats a la composició del propi sòl. A més, en dur a terme l'anàlisi d'un sòl contaminat per derivats fenòlics, la concentració d'aquests compostos que trobarem serà diferent en funció del temps que deixem passar entre l'abocament i la seva anàlisi. D'aquesta manera la informació que obtindrem serà temporal i només reflectirà el nivell de contaminació present en el moment de la presa de mostra el qual, en general, serà menor que el que realment hagi patit el sòl.

4.4 REFERÈNCIES

1. N.C. Brady, R.R. Weil, *The nature and properties of soils*, Pearson Education, (Estats Units) (2002), ISBN 0-13-016763-0.
2. O. Jáuregui, F.J. Santos, F.J. Pinto, M.T. Galceran, *Quim Anal.* 16 (1997) 247.
3. O. Jáuregui, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 241.
4. E. Egizabal, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Analyst* 123 (1998) 1679.
5. O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Quim Anal.* 20 (2001) 131.
6. D. Li, J.-R. Oh, J. Park, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 207.
7. J.R. Dean, *Methods for environmental trace analysis*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex (Anglaterra) (2003) ISBN 0-470-84422-1.
8. P. Hancock, J.R. Dean, *Anal. Commun.* 34 (1997) 377.
9. J. Frébortová, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (1995) 1930.
10. W.E. Rae, C.A. Lucy, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1308.
11. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2687.
12. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4265.
13. M. Czaplicka, *Chromatographia* 53 (2001) S-470.
14. O.P. de Amarante Jr., N.M. Brito, T.C.R. dos Santos, G.S. Nunes, M.L. Ribeiro, *Talanta* 60 (2003) 115.
15. X. Li, Z. Zeng, J. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 509 (2004) 27.
16. V. Lopez-Avila, R. Young, W.F. Beckert, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097.
17. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 279.
18. J. Patsias, E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 153.
19. M.-C. Wei, J.-F. Jen, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 111.
20. Y. Hu, Y. Zheng, G. Li, *Anal. Sci.* 20 (2004) 667.
21. C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 133.
22. C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
23. M.P. Llompарт, R.A. Lorenzo, R. Cela, K. Li, J.M.R. Bélanger, J.R. Jocelyn Paré, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 243.
24. F.I. Onuska, K.A. Terry, *Chromatographia* 36 (1993) 191.

25. L. Sun, H.K. Lee, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 67.
26. J.R. Jocelyn Paré, J.M.R. Bélanger, B. Lesnik, R. Turpin, R. Singvi, *Soil & Sediment Contamination* 10 (2001) 375.
27. V. Camel, *TrAC Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229.
28. J.R. Dean, A. Santamaria-Rekondo, E. Ludkin, *Anal. Commun.* 33 (1996) 413.
29. J. Kronholm, P. Revill-Ruiz, S.P. Porras, K. Hartonen, R. Carabias-Martínez, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 9.
30. L. Wennrich, P. Popp, M. Moder, *Anal. Chem.* 72 (2000) 546.
31. M. Petrovic, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 15.
32. K. Li, M. Landriault, M. Fingas, M. Llompert, *J. Hazard. Mater.* 102 (2003) 93.
33. Y.S. Fung, Y.H. Long, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 301.
34. O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 225.
35. M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 819 (1998) 197.
36. M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, B.-H. Hwang, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 317.
37. R. Baciocchi, M. Attinà, G. Lombardi, M.R. Boni, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 135.
38. V.P. Evangelou, *Environmental soil and water chemistry. Principles and applications*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1998) ISBN 0-471-16515-8.
39. S. Moret, J.M. Sánchez, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Chromatogr. A*, *submitted*.
40. P. Barták, P. Frnková, L. Cáp, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 281.
41. Y.I. Korenman, I.V. Gruzdev, B.M. Kondratenok, *J. Anal. Chem.* 56 (2001) 166.
42. US EPA method 3540, *Soxhlet Extraction*, in Federal Register, Revision 3, December 1996, Environmental Protection Agency, Washington, DC (Estats Units).
43. A. Bhandari, J.T. Novak, W.D. Burgos, D.F. Berry, *J. Environ. Eng.-ASCE* May (1997) 506.

CAPÍTOL 5

ESTUDI DE L'ADSORCIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN SÒLS DE DIFERENTS CARACTERÍSTIQUES

| | |
|---|------------|
| 5.1 INTRODUCCIÓ..... | 181 |
| 5.1.1 L'adsorció com a mètode d'eliminació de contaminants | 182 |
| 5.1.2 El paper de l'adsorció en la mobilitat dels contaminants en el medi | 184 |
| 5.1.3 Mecanismes d'adsorció | 186 |
| 5.1.4 Caracterització de l'adsorció | 188 |
| 5.1.4.1 Isotermes d'adsorció..... | 188 |
| 5.1.4.1.1 Modelització dels processos d'adsorció..... | 190 |
| 5.2 EXPERIMENTAL | 194 |
| 5.2.1 Reactius..... | 194 |
| 5.2.2 Aparells i material..... | 194 |
| 5.2.3 Procediment experimental | 195 |
| 5.2.3.1 Anàlisi de compostos fenòlics | 195 |
| 5.2.3.2 Estudis d'adsorció | 195 |
| 5.2.3.2.1 Cinètiques d'adsorció..... | 196 |
| 5.2.3.2.2 Isotermes d'adsorció | 196 |
| 5.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ | 197 |
| 5.3.1 Caracterització del mètode cromatogràfic | 197 |
| 5.3.2 Estudis d'adsorció..... | 199 |
| 5.3.2.1 Estudis preliminars | 201 |
| 5.3.2.1.1 Cinètiques d'adsorció..... | 201 |
| 5.3.2.1.2 Selecció de la relació sòl:solució | 204 |
| 5.3.2.1.3 Assaigs de control | 205 |
| 5.3.2.2 Isotermes d'adsorció..... | 205 |
| 5.4 REFERÈNCIES..... | 216 |

5.1 INTRODUCCIÓ

L'adsorció és un fenomen fisicoquímic que pot ser definit com l'acumulació d'un determinat compost a la superfície o interfase entre dues fases. Aquestes fases poden ser qualsevol de les següents combinacions: líquid-líquid, líquid-sòlid, gas-líquid i gas-sòlid. La fase que adsorbeix s'anomena adsorbent i qualsevol substància que sigui adsorbida s'anomena adsorbat [1].

En aquesta memòria s'estudia l'adsorció sobre sòlids de substàncies presents en fases líquides (adsorció líquid-sòlid). En aquest cas, els processos d'adsorció poden tenir dues finalitats, per una banda la investigació de sorbents amb aplicabilitat per a l'eliminació de substàncies contaminants d'afluent aquosos i, per l'altra, l'estudi del destí dels contaminants

un cop abocats al medi ambient (estudis d'adsorció sobre sòls) per tal de predir l'impacte que aquests causaran sobre el medi natural.

5.1.1 L'adsorció com a mètode d'eliminació de contaminants

L'adsorció sobre sòlids adsorbents és un procés que té una gran transcendència ambiental ja que és capaç d'eliminar substàncies contaminants tant d'afluents aquosos com gasosos. Aquesta tècnica és molt aplicada a l'eliminació de compostos fenòlics d'aigües residuals juntament amb altres processos com la degradació biològica, l'oxidació química (emprant agents tal com ozó, peròxid d'hidrogen o diòxid de clor), la incineració, l'extracció amb solvents o la irradiació.

La viabilitat de l'adsorció com a mètode de tractament passa per una correcta selecció de l'adsorbent. Es considera que els atributs més importants d'un adsorbent són la seva capacitat, entesa com la quantitat de solut que pot ser eliminada per un pes donat de sorbent, i les característiques cinètiques del sistema, però també caldrà considerar el seu cost i el potencial de regeneració.

El carbó actiu és el sorbent més àmpliament utilitzat per a l'adsorció de contaminants orgànics entre els quals trobem els compostos fenòlics. El seu alt grau de porositat i una àrea superficial extensa fan que aquest material presenti una elevada capacitat d'adsorció per a molts tipus de compostos. Aiouèche et al. [2] proposen una tècnica d'activació de carbó basada en l'aplicació d'un camp elèctric que és capaç de millorar significativament la capacitat d'adsorció d'aquest material per al fenol. Un inconvenient del carbó actiu comercial és el seu elevat cost pel que s'intenten trobar matèries primeres més assequibles per preparar el carbó que s'utilitzarà com adsorbent. Residus carbonosos i de tipus mineral són considerats com alternatives de baix cost al carbó actiu. Alguns d'aquests materials són subproductes agrícoles o industrials i la seva reutilització com a adsorbents contribueix a la recuperació de residus. Exemples de residus tractats i reutilitzats per a l'adsorció de compostos fenòlics són carbons preparats a partir de llavor de caudú [3], clofolla de coco [4] o restes de cendres [5]. En aquest últim cas no és necessari aplicar cap tractament previ a la seva utilització com a adsorbent per a fenol, o-hidroxifenol, m-hidroxifenol i 4-nitrofenol. Nakagawa et al. [6] reutilitzen envasos de plàstic, pneumàtics i residus procedents de la fermentació de deixalles domèstiques per preparar carbons i troben que les capacitats assolides per aquests materials per al fenol són comparables a les obtingudes per carbons actius comercials.

Un altre grup de materials utilitzats per a l'adsorció de compostos fenòlics són sorbents polimèrics, els quals ja s'han descrit en el **capítol 2**, doncs també s'utilitzen per a la preconcentració de fenols en l'anàlisi d'aigües. Alguns dels materials polimèrics emprats en estudis d'adsorció són copolímers d'acrilonitril o metacrilonitril amb divinilbenzè [7], poliestirè-divinilbenzè o poli (*N*-p-vinilbenzil acetilamida) [8]. Li et al. [9] comparen l'eficiència de la resina Amberlite XAD-4 (poliestirè-divinilbenzè) amb la del seu derivat acetilat MX-4 en l'adsorció de fenol, p-cresol, 4-clorofenol i 4-nitrofenol i observen que la capacitat de MX-4 per aquests compostos és fins a un 20% superior a la del seu precursor. Aquest increment es deu, per una banda, a l'augment de l'àrea superficial provocat per la introducció del modificador i, per l'altra, al fet que el grup carbonílic del substituïent acetil actua com a una base de Lewis més forta que l'anell aromàtic de la resina XAD-4 i, en conseqüència, s'espera que MX-4 presenti una major interacció amb els compostos fenòlics, considerats com a àcids de Lewis. L'augment de la capacitat d'adsorció de fenols per la incorporació de grups polars a la superfície de l'adsorbent també es veu reflectit en un treball posterior dels mateixos autors [10] en el que comparen de nou l'eficiència de l'adsorbent XAD-4 amb la d'un nou polímer de base de poliestirè-divinilbenzè però en el que s'han introduït grups carbonil, hidroxil i clorometil a la seva superfície (NJ-8). En aquest cas també s'ha de tenir en compte que l'adsorbent NJ-8 presenta una distribució de porus amb una major àrea interna que facilita l'acomodament dels compostos estudiats en el seu interior. Pan et al. [11] comproven que la modificació d'un sorbent polimèric amb grups amino millora l'adsorció de set compostos fenòlics, àcid ftàlic i àcid benzensulfònic degut a l'establiment d'enllaços per pont d'hidrogen entre els adsorbats i els grups amino de l'adsorbent.

Altres materials estudiats per a la recuperació de fenols de matrius aquoses són la sílice i l'alúmina activada [12] els quals resulten ser ineficients a menys que aquest últim es modifiqui amb tensioactius com el dodecilsulfat de sodi (SDS), que tendeix a agregar-se formant micel·les a la superfície de l'alúmina les quals són capaces d'incorporar compostos orgànics amb caràcter hidrofòbic com certs clorofenols [13]. També s'ha avaluat l'efectivitat de polímers naturals com el *chitosan* (poli D-glucosamina) [14], matèries húmiques extretes de medis hídrics naturals [15,16], argiles naturals modificades amb cadenes alquíliques [17] o zeolites [12,18]. Aquests últims materials tenen l'avantatge de ser fàcilment regenerats; s'ha comprovat que la capacitat d'adsorció per a fenol d'una zeolita comercial (HiSiv 1000, UOP Molecular Sieve, Estats Units) no disminueix ni després de 14 cicles d'adsorció-regeneració en els quals aquesta última etapa té lloc exposant el material a 360°C durant 16 hores.

5.1.2 El paper de l'adsorció en la mobilitat dels contaminants en el medi

L'adsorció és un procés important aplicable a l'hora de predir el destí dels compostos químics un cop han estat abocats al sòl. El sòl actua com un filtre químic i biològic dels contaminants capaç de reduir, en alguns casos, l'impacte d'aquestes substàncies al medi ambient. El grau d'afinitat d'un compost orgànic per la superfície d'un sòl afecta a la seva bioactivitat, persistència, mobilitat i volatilitat. Així doncs, conèixer en quina proporció un determinat compost s'enllaça al sòl ens permetrà pronosticar si aquest tindrà més o menys tendència a arribar a les aigües, tant superficials com subterrànies. L'extensió de l'adsorció està relacionada amb les característiques del sòl, com el seu contingut en matèria orgànica, el contingut i tipus d'argila, la capacitat d'intercanvi o l'acidesa, i també amb alguns paràmetres físics i químics dels adsorbats, com la seva solubilitat en aigua. Algunes vegades, propietats associades tant a l'adsorbent com a l'adsorbat ens poden servir per fer prediccions sobre el comportament d'aquest últim en el medi encara que no es disposi de dades experimentals. En aquest sentit, Gawlik et al. [19] demostren que les dades d'adsorció obtingudes experimentalment per a més de 40 compostos orgànics no ionitzables es poden correlacionar de forma satisfactòria amb el seu comportament cromatogràfic en un sistema de cromatografia líquida que utilitza una columna de fase cianopropílica, fent possible l'estimació dels coeficients d'adsorció d'aquestes substàncies en els anomenats Eurosòls (cinc sòls que, per les seves propietats, es considera que són representatius de tots els territoris de la Unió Europea) amb la mesura del seu factor de capacitat en el sistema HPLC citat.

Són nombrosos els estudis realitzats per establir la capacitat d'adsorció de compostos fenòlics en sediments [20] i en sòls [21-25]. La majoria d'aquests treballs coincideixen a destacar que el contingut en matèria orgànica del sòl és un dels factors més relacionats amb la capacitat d'adsorció que presenta aquest sòl per als compostos fenòlics. Així, un sòl amb un alt contingut en carbó orgànic mostra una capacitat d'adsorció més gran per a la majoria de fenols i, en conseqüència, es retarda el seu transport cap a les aigües subterrànies. Aquesta immobilització al sòl, a la vegada, afavoreix la degradació biològica d'aquestes substàncies. Per contra, un sòl amb un baix contingut en matèria orgànica presenta un factor de retenció menor i condiona que les substàncies fenòliques presentin una major mobilitat i es distribueixin en horitzons més profunds del sòl. L'afinitat dels compostos fenòlics per la fracció orgànica del sòl és molt gran; Bollag et al. [26] demostren, per al cas del 2,4-diclorofenol, que aquest compost és capaç d'incorporar-se a l'humus per mitjà de varis mecanismes com enllaços electrostàtics, enllaços per pont d'hidrogen o reaccions

d'acoblament oxidatiu catalitzades per enzims. Bhandari et al. [27] demostren que aquest acoblament pot ser irreversible sobretot per a fenols amb un grau de cloració elevat.

A més del contingut en matèria orgànica d'un sòl, la naturalesa d'aquesta també juga un paper important en les capacitats d'adsorció per a compostos fenòlics, al igual que per a molts altres contaminants orgànics [28]. La matèria orgànica d'un sòl es pot classificar atenent a l'estadi de degradació en que es troba o bé, en una segona classificació, es pot diferenciar entre substàncies húmiques i substàncies no húmiques [29]. En funció del grau de degradació ens podem trobar amb materials inalterats o compostos transformats que no conserven cap similitud estructural amb la seva font d'origen. Les substàncies húmiques es defineixen com orgànics que provenen de la descomposició química i biològica de materials no húmics, els quals són compostos inalterats o parcialment degradats. Les substàncies húmiques, diferenciades en àcids húmics, àcids fúlvics i humines en funció de la seva solubilitat, són polímers majoritàriament aromàtics de pesos moleculars elevats que poden contenir diferents grups funcionals com grups hidroxil, àcids carboxílics, fenols o amines. El grau d'aromaticitat i el contingut en grups funcionals d'aquestes substàncies varia en funció de l'origen i del clima en que s'ha desenvolupat el sòl i s'ha trobat a la literatura que la seva fracció aromàtica pot variar entre el 35 i el 92% [30]. Le Boeuf i Weber [31] formulen una hipòtesi en la que s'afirma que la matèria orgànica del sòl sembla estar dividida en dues fraccions que es diferencien entre si per la seva reactivitat: una fracció que anomenen *tova*, altament amorfa, i una fracció *dura* o condensada que posseeix un elevat grau d'entrecreuament. Segons aquests autors, les dues fraccions presenten diferents comportaments pel que fa a la seva capacitat d'adsorció. Mentre l'adsorció a la fracció *tova* és ràpida, acostuma a ser lineal i no presenta competència de tipus solut-solut, la fracció *dura* promou una adsorció més lenta, no lineal i amb competència solut-solut per a compostos hidrofòbics. També és possible que part de la matèria orgànica sigui inaccessible als compostos que entren en contacte amb el sòl ja sigui perquè es troba formant agregats amb argiles o amb altres partícules. En aquests casos, la quantitat de matèria orgànica que pot actuar com a adsorbent per a aquests compostos és menor al contingut orgànic total del sòl i és possible observar capacitats d'adsorció per sota de les que es podrien predir a priori [32]. Es dedueix, doncs, que la fracció orgànica dels sòls és molt heterogènia ja que pot contenir molts tipus de substàncies i en diferents proporcions. Això provoca que el grau d'adsorció que s'observa per als compostos fenòlics, a l'igual com per a la majoria de xenobiòtics, sigui altament dependent de les característiques de cada sòl en concret. En alguns estudis de complexació, adsorció o transport, s'utilitzen fraccions específiques aïllades del contingut orgànic total d'un sòl per mitjà de tècniques químiques. En

aquests casos, els tractaments aplicats poden alterar la conformació i la reactivitat del material original pel que és difícil extrapolar les dades obtingudes a les condicions naturals en les que la fracció aïllada només representa una petita part del total de matèria orgànica [33]. Altres estudis han servit per concloure que les substàncies húmiques comercials no són representatives d'aquelles que es troben de forma natural en ambients tant terrestres com aquàtics [34,35].

Un altre paràmetre que condiciona el grau d'adsorció d'un determinat compost en un sòl és la distribució de mida de partícules del mateix. Haberhauer et al. [36] observen que per a quatre plaguicides fenoxiàcids i els seus derivats fenòlics, 2,4-diclorofenol, 4-cloro-2-metilfenol i 4-clorofenol, l'adsorció augmenta en disminuir la mida de partícula en l'ordre argila > llim > sorra. El fet que l'argila tingui una capacitat d'adsorció superior a la de les altres dues fraccions del sòl es deu a que té un major contingut en carbó i una major àrea superficial.

Igualment s'han dut a terme estudis en els quals s'avalua el comportament pel que fa a la desorció de compostos fenòlics presents en sòls utilitzant diferents solucions com clorur càlcic [36,37] o aigua a pH àcid [38,39]. En aquest sentit, You et al. [40] demostren que la desorció de 2,6-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol i pentaclorofenol presents en dos sòls de diferents característiques és més important en augmentar el pH de la solució emprada, alhora que el grau de desorció de pentaclorofenol es veu incrementat de forma important si la solució d'estudi conté metanol o tensioactius aniònics.

5.1.3 Mecanismes d'adsorció

L'estudi dels mecanismes d'adsorció inclou l'anàlisi de tots aquells processos que fan possible que un determinat compost s'acumuli sobre la superfície o a l'interior d'un sòlid. Les forces implicades en aquests processos són de naturalesa diversa i no sempre és fàcil identificar inequívocament la contribució de cada una d'elles en un determinat sistema sòl-solut. Podem agrupar els processos de transferència de soluts des d'una fase aquosa a un sòl en tres categories: **sorció**, **complexació** i **precipitació** [29]. El terme sorció o adsorció s'utilitza per designar mecanismes en els que els soluts es distribueixen entre una fase líquida i el sòl i hem de distingir entre els processos de caràcter físic (fisisorció), governats principalment per reaccions d'intercanvi iònic o forces de Van der Waals, i els processos químics (quimisorció), els quals impliquen la formació d'enllaços químics entre les molècules

d'adsorbat i la superfície del sòl. En els mecanismes de fisorció s'estableixen forces intermoleculars febles que no impliquen ni la compartició ni la transferència d'electrons per la qual cosa són totalment reversibles i la variació d'entalpia involucrada en aquests processos és baixa. A més, no són mecanismes específics i les molècules de solut no s'enllacen en punts determinats de l'adsorbent sinó que es poden distribuir per tota la seva superfície. Els processos de quimisorció, per contra, provoquen la formació d'enllaços químics (covalents o iònics) dels soluts en punts específics dels adsorbents, els quals acostumen a ser irreversibles i les energies d'activació que s'han de superar poden ser elevades pel que la consecució d'aquests processos pot ser altament dependent de la temperatura del sistema [1]. En el procés d'adsorció intervenen tant les propietats superficials del sòl, regides pel tipus de grups funcionals o components que aquest conté, com les propietats físico-químiques dels soluts. En els casos en que les substàncies a adsorbir poden patir ionització (i.e. els compostos fenòlics) també s'ha de tenir en compte el pH del sistema. La complexació és un fenomen que té lloc quan un catió metàl·lic (el solut en aquest cas) forma enllaços de coordinació amb grups específics dels components del sòl, que actuen com a lligands. Per últim, un tercer mecanisme que es pot donar entre un sòl i un solut és la precipitació d'aquest últim. Aquest procés depèn en gran mesura del pH del sòl, del pH de la solució que conté el solut i de la concentració d'aquest.

Els compostos fenòlics poden interaccionar amb el sòl bé a través del grup OH, que és capaç de formar enllaços per pont d'hidrogen, o bé a través de l'anell aromàtic per interaccions de tipus π - π amb les substàncies húmiques. En general els autors coincideixen a afirmar que per al cas dels clorofenols, un augment en el nombre d'àtoms de clor a la molècula es tradueix en un augment de la seva adsorció en els sòls [21,23,25]. L'augment de la hidrofobicitat i una disminució de la solubilitat en solucions aquoses per als compostos més clorats provoca aquest comportament. No obstant, Boyd [24] troba que, en alguns casos, l'adsorció observada en els seus estudis és superior a la que es podria esperar només tenint en compte les interaccions hidrofòbiques citades anteriorment. Aquestes "irregularitats" s'expliquen considerant que és possible la formació d'enllaços d'hidrogen a través del grup hidroxil fenòlic i amb posicions específiques de la matèria orgànica i l'argila presents al sòl. Així, per exemple, la presència de substituents electró-donadors a l'anell aromàtic augmenta el caràcter bàsic del grup OH i d'aquesta manera s'incrementa la possibilitat de formació d'enllaços d'hidrogen actuant com a un acceptor de protons. Els factors estèrics també influeixen en l'extensió en que es formen aquests enllaços per pont d'hidrogen: la introducció en posició orto de grups $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ i $-\text{Cl}$ resulta en una disminució de l'adsorció si la

comparem amb la que es dona si les substitucions tenen lloc en la posició para. Per últim, per al cas del catecol, l'existència de dos grups OH a la molècula, realça la formació d'enllaços d'hidrogen doblant la capacitat d'adsorció d'aquesta substància per aquesta via.

5.1.4 Caracterització de l'adsorció

Per tal d'estudiar les característiques adsorptives dels sòls es poden utilitzar dos tipus de tècniques experimentals que ens proporcionen informació diferent. Per una banda, els **estudis en batch** estan dissenyats per analitzar els equilibris d'adsorció de sòl prèviament assecat i homogeneïtzat en contacte amb solucions d'un determinat compost a diferents concentracions. Com a norma general, una vegada es posa en contacte un adsorbent amb una fase líquida que conté un adsorbat, el procés d'adsorció evoluciona fins que s'assoleix l'equilibri entre les concentracions d'adsorbat a la fase sòlida i en solució. Aquests estudis permeten avaluar el comportament del sòl en aquest cas davant de concentracions creixents d'un determinat compost. Per altra banda, el segon tipus d'estudi són els **tests en columna** que es poden realitzar amb un sòl inalterat, és a dir, que conserva la seva estratificació i la distribució dels components que presenta en la seva forma natural. El sòl es disposa a l'interior d'una columna d'acer i es fa passar a través seu una solució del compost a estudiar per avaluar la interacció d'aquest amb el sòl, la seva velocitat de migració i l'existència o no de camins preferents [29].

5.1.4.1 Isotermes d'adsorció

Les isotermes d'adsorció descriuen les relacions d'equilibri entre un adsorbent i un adsorbat i les dades que les caracteritzen s'extreuen dels estudis en *batch* descrits a l'apartat anterior. Són representacions gràfiques de les concentracions de solut adsorbides al sòl en funció de les concentracions que romanen en solució un cop el sistema ha assolit l'equilibri. Poden donar-se diferents relacions isotèrmiques d'adsorció, és a dir, entre la capacitat d'adsorció ($\mu\text{g solut} / \text{g adsorbent}$) i la concentració residual de solut en la solució, tal com es pot veure a la **Figura 5.1**. Els quatre tipus bàsics són els que es designen amb les lletres L, S, C i H. Les isotermes d'adsorció de tipus L descriuen una elevada afinitat entre l'adsorbat i l'adsorbent: l'adsorció creix a l'augmentar la concentració de solut fins que s'arriba a la saturació del sòlid. Poden ser indicatives de processos de quimisorció. Les isotermes de tipus H, per la seva banda, representen el cas extrem de l'exemple anterior. Són indicadores d'una

forta interacció entre els punts actius de l'adsorbent i les molècules de solut, les quals queden totalment adsorbides fins a assolir la capacitat màxima de l'adsorbent. Les corbes convexes (L i H) es coneixen com a isoterms favorables, doncs suposen l'obtenció d'una càrrega d'adsorbat força alta en fase sòlida en equilibri amb una concentració d'aquesta substància prou baixa en el fluid. El cas oposat a l'adsorció favorable és el representat per les corbes còncaues conegudes com a isoterms desfavorables (no representades a la **Figura 5.1**) les quals són poc freqüents [41]. Les representacions conegudes com a isoterms C descriuen una situació de partició que sovint suggereix la interacció entre un sorbent hidrofòbic i un solut també hidrofòbic. S'estableix una relació constant entre la quantitat de solut fixat damunt el sòlid i la concentració que resta en solució. Aquest tipus d'isoterma es presenta poques vegades a la pràctica i representa la situació inicial de les isoterms S i L quan es treballa amb solucions molt diluïdes de solut. Totes les formes descrites fins al moment representen sistemes on l'adsorció té lloc en una sola capa de molècules sobre l'adsorbent però podem trobar-nos amb el cas que es doni adsorció cooperativa (isoterma S) en la que interaccions de tipus adsorbat-adsorbat són més fortes que les interaccions entre l'adsorbat i la superfície del sòlid.

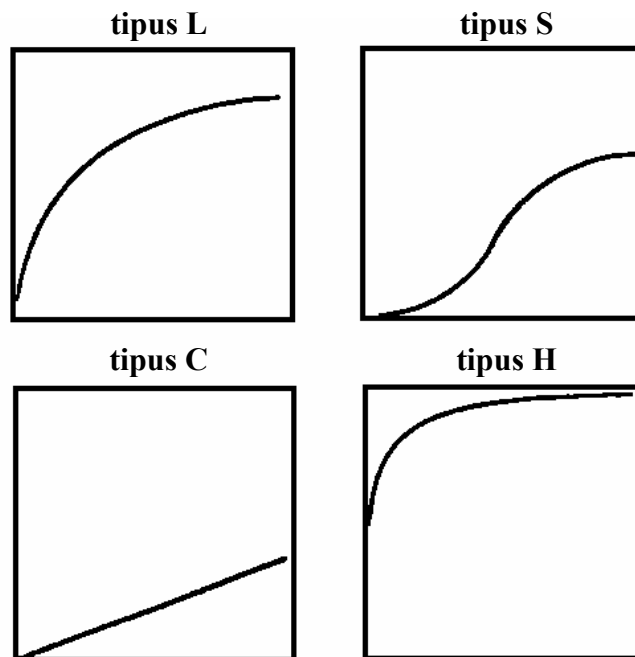


Figura 5.1 Les quatre formes bàsiques d'isoterms d'adsorció. Eix de les x: concentració de solut en solució a l'equilibri ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); eix de les y: concentració de solut adsorbida a l'equilibri ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

A part de les quatre isoterms bàsiques representades a la **Figura 5.1**, també es poden obtenir formes més complexes encara que poden considerar-se híbrids de les anteriors. És important tenir en compte que la forma de la representació gràfica obtinguda a partir de les dades d'adsorció no ens proporciona informació suficient per establir de forma inequívoca els mecanismes involucrats en el procés. Pot indicar quines són les interaccions que, amb més probabilitat, s'estan produint entre adsorbent i adsorbat però sempre cal una confirmació per mètodes més directes com l'espectroscopia molecular.

5.1.4.1.1 Modelització dels processos d'adsorció

Existeixen un gran nombre d'expressions matemàtiques per descriure l'equilibri isotèrmic d'adsorció, cadascuna d'elles amb un nivell de complexitat diferent. Els estudis d'adsorció que van portar al plantejament d'aquestes expressions matemàtiques es van dur a terme principalment en sistemes de tractament de gasos. L'aplicació d'aquestes expressions a l'adsorció de components d'una dissolució s'ha demostrat també vàlida en la majoria de casos [42].

L'expressió més simplificada correspon al cas d'**isoterma lineal** també coneguda com a **lleï de Henry**. A concentracions molt baixes d'adsorbat a la fase líquida, les molècules adsorbides es troben molt separades sobre la superfície de l'adsorbent de manera que cap d'elles no interaccionarà ni influirà en l'adsorció de les altres. En aquest cas és lícit assumir que la concentració d'adsorbat en una fase és directament proporcional a la concentració en l'altra (**Taula 5.1**).

Els models de Freundlich i Langmuir, tot i ser introduïts per primera vegada fa gairebé un segle, encara continuen essent les dues equacions més utilitzades per la seva capacitat d'ajustar les dades experimentals d'adsorció de molts tipus de sistemes adsorbent-adsorbat. El seu èxit recau, majoritàriament, en la facilitat en que es poden estimar els paràmetres que caracteritzen el procés d'adsorció en aquests models, ja sigui mitjançant l'ajust de les dades amb les equacions generals o bé a partir d'ajustos lineals de les mateixes en els que aquests paràmetres es calculen a partir del pendent i l'ordenada a l'origen de l'equació de la recta obtinguda [43]. Ambdós mètodes suposen una adsorció monocapa en la que no es donen interaccions entre les diferents molècules de solut.

El **model de Langmuir** va ser desenvolupat originàriament per descriure sistemes en els quals tenia lloc adsorció química en llocs específics de la superfície d'un adsorbent. Considera un equilibri d'adsorció dinàmic en el que unes molècules d'adsorbat es van unint a

la superfície del sòlid mentre se'n desorbeixen d'altres i s'assoleix l'equilibri quan s'igualen les velocitats dels dos processos. A banda de les consideracions cinètiques, l'equació de Langmuir es deriva d'una sèrie d'assumpcions: la superfície de l'adsorbent és homogènia, tots els punts d'enllaç són energèticament idèntics i les molècules adsorbides ho fan en llocs fixes sense interaccionar entre elles i no es desplacen sobre la superfície de l'adsorbent. L'equació del model és la que es pot veure a la **Taula 5.1** a partir de la qual es pot calcular la capacitat d'adsorció màxima per a un solut donat (Q_{\max}). En el punt de saturació, quan la concentració de solut en solució tendeix a infinit, la quantitat adsorbida tendeix a Q_{\max} , mentre que a baixes concentracions, la isoterma de Langmuir convergeix amb la llei de Henry pel que dóna una relació lineal [1].

| Isoterma | Expressió matemàtica |
|------------------------------|--|
| Llei de Henry | $q = K_H C_{eq}$ |
| Langmuir | $q = \frac{b Q_{\max} C_{eq}}{1 + b C_{eq}}$ |
| Freundlich | $q = K_F C_{eq}^{1/n}$ |
| Redlich-Peterson | $q = \frac{b Q_{\max} C_{eq}}{1 + (b Q_{\max})^B}$ |
| Langmuir-Freundlich | $q = \frac{(b C_{eq})^B Q_{\max}}{1 + (b C_{eq})^B}$ |
| BET | $q = \frac{b Q_{\max} C_r}{(1 - C_r) \cdot (1 - C_r + b C_r)}$ |
| Jaeder i Erdös | $q = \frac{A Q_{\max} C_{eq}^B}{1 + A C_{eq}^B}$ |
| q | capacitat a l'equilibri (μg adsorbat / g adsorbent) |
| C_{eq} | concentració a la solució a l'equilibri (μg adsorbat / mL) |
| K_H | coeficient de la llei de Henry |
| b | paràmetre d'afinitat |
| Q_{\max} | capacitat d'adsorció màxima |
| K_F | constant relacionada amb la capacitat d'adsorció (Freundlich) |
| C_r | concentració reduïda ($C_{\text{equilibri}} / C_{\text{saturació}}$) |
| 1/n, A, B | paràmetres empírics |

Taula 5.1 Models matemàtics que descriuen l'equilibri isotèrmic d'adsorció [43]

La **isoterma de Freundlich** és, probablement, l'equació més utilitzada donat que condueix generalment a un bon ajust, malgrat presentar algunes limitacions. Segons l'equació de Freundlich (**Taula 5.1**), la quantitat de solut adsorbida augmenta en augmentar la concentració del mateix en dissolució pel que l'ajust per a sistemes amb una cobertura superficial elevada no és bo i a concentracions baixes no convergeix cap a la isoterma lineal. La isoterma de Freundlich ha estat deduïda fent una sèrie de supòsits: no es produeix associació, dissociació ni canvi en la configuració de les molècules un cop aquestes estan adsorbides, hi ha una absència completa d'adsorció química i assumeix que la superfície és heterogènia i que l'adsorció en cada tipus de punts actius obeeix l'equació de Langmuir. En general, un gran nombre de resultats experimentals en els quals té lloc una adsorció a través d'interaccions de tipus Van der Waals poden ser expressats a través de l'equació de Freundlich en un rang de concentració intermig [1]. Els paràmetres que es poden calcular a partir de l'equació de Freundlich són la constant K , que és una mesura del grau d'adsorció i la constant n , que és un paràmetre empíric que varia amb el grau d'heterogeneïtat de l'energia associada en el procés d'adsorció. En general, valors de $n < 1$, representats com a gràfics convexos, són indicatius d'adsorció en medis heterogenis en els quals primer s'ocupen els punts actius d'elevada energia i després els de menor energia. Quan $n > 1$ s'obtenen gràfics amb forma còncava; en aquests casos, les molècules que s'adsorbeixen en primer lloc modifiquen la superfície del sòlid de tal manera que s'afavoreix l'adsorció de posteriors molècules. Per últim, un valor de $n = 1$ es tradueix en una isoterma de tipus lineal [22].

S'han proposat moltes altres equacions per a isotermes que descriuen els equilibris d'adsorció partint d'assumpcions similars a les anterior i d'altres de més complexes. La majoria d'elles, però, contenen un major nombre de paràmetres a ajustar i precisen d'algoritmes complexes. La **isoterma de Redlich-Peterson** (**Taula 5.1**) és una equació més general que les de Freundlich i Langmuir, doncs assumeix l'adsorció en superfícies heterogènies més enllà d'una sola capa de molècules d'adsorbent retingudes i, alhora, té un rerafons termodinàmic que li dona convergència amb la llei de Henry a baixes concentracions d'adsorbat. Tot i ser una equació apta per descriure un gran nombre de sistemes, no és massa utilitzada, bàsicament a causa de la dificultat que representa l'ajust de tres paràmetres. El mateix succeeix amb la **isoterma de Langmuir-Freundlich** (**Taula 5.1**); aquesta intenta aprofitar el bon ajust generalment aconseguit amb la isoterma de Freundlich donant consistència termodinàmica a l'equació proposada. Una altra expressió que val la pena comentar és la **isoterma de Brunauer, Emmet i Teller**, més coneguda com la **isoterma BET**

(**Taula 5.1**), la qual admet l'existència de vàries capes d'adsorbat encara que assumeixi que la superfície buida o associada a una monocapa, bicapa, etc. és constant per a unes condicions d'equilibri determinades. En aquest cas, cada molècula adsorbida serveix de lloc per a una segona capa i així successivament. La **isoterma de Jaeder i Erdös (Taula 5.1)** pretén resumir en una equació general les expressions de les diferents isoterms proposades fins al moment. Diferents autors han proposat isoterms basades en diferents supòsits però totes elles són versions simplificades de la isoterma de Jaeder i Erdös [41].

Cap de les isoterms comentades es pot aplicar de manera universal, com tampoc es pot predir quina donarà un millor ajust a un sistema en particular. Les expressions més simples són les de Langmuir i Freundlich les quals presenten un bon ajust de les dades experimentals sense una complexitat excessiva en els càlculs.

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 Reactius

- Fenol: sòlid, 99.5%, ref. C16025000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2-clorofenol: líquid, 99.5%, ref. C11470000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2-nitrofenol: sòlid, 98.5%, ref. C155902, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- 2,4-diclorofenol: sòlid, 99.5%, ref. C12451000, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanya).
- Clorur de calci anhidre (CaCl_2): sòlid puríssim, 95%, ref. 141219, Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanya).
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-PLUS per a HPLC >99.9%, ref. 412392, Carlo Erba (Rodano, Itàlia).
- Àcid acètic (CH_3COOH): líquid, 99.7% ACS reagent, ref. 32009-9, Aldrich (Steinheim, Alemanya).

Totes les solucions de fenols es preparen en medi clorur de calci 0.01M. Els patrons de calibratge es preparen per dilució d'una solució mare que conté els quatre compostos objecte d'estudi a una concentració aproximada de $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Els experiments d'adsorció es realitzen amb cadascun dels fenols de forma individual excepte pel cas dels estudis cinètics. Les solucions de treball utilitzades per determinar les isoterms d'adsorció són dissolucions individuals de cada compost a concentració de 200 o $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.2.2 Aparells i material

- Cromatògraf líquid Spectra System de Thermofinnigan (San Jose, CA, Estats Units) equipat amb una vàlvula d'injecció Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, Estats Units) amb un *loop* de $20 \mu\text{L}$, bomba peristàltica P2000, sistema de desgasificació SCM1000, controlador SN4000 i detector UV-Vis de diodes en línia. Per dur a terme la separació dels anàlits s'utilitza una columna cromatogràfica Kromasil 100 C18 de $5\mu\text{m}$ de mida de partícula i $20\text{cm}\times 0.46\text{cm}$ i.d. (ref. TR-011942) amb una precolumna de tipus ODS (ref. TR-C-160-1), ambdues de Teknokroma (Barcelona, Espanya).

- Agitador rotatori ROTARY MIXER, DINKO Instruments (Barcelona, Espanya).
- Centrífuga Mixtasel, Pselecta (Abrera, Espanya).
- pH-metre GLP22, Crison (Barcelona, Espanya).
- Filtres de xeringa de 25 mm de diàmetre i 0.45 μm de mida de porus, ref. TR-200104, Teknokroma (Barcelona, Espanya).
- Balança analítica electrònica A200S amb una precisió de ± 0.1 mg, Sartorius Analytic (Göttingen, Alemanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de 47 mm i 0.45 μm de mida de porus, ref. 7404-004, Whatman (Maidstone, Regne Unit).
- Xeringues per a HPLC de 100 μL , Hamilton (Bonaduz, Suïssa).
- Tamís molecular de 2 mm de llum, ref. 013148.4, Cisa (Barcelona, Espanya).

5.2.3 Procediment experimental

5.2.3.1 Anàlisi de compostos fenòlics

Els compostos estudiats en aquest capítol són quatre dels fenols inclosos en les llistes de contaminants prioritari de la EPA: fenol (Ph), 2-clorofenol (2CP), 2-nitrofenol (2NP) i 2,4-diclorofenol (24DCP). La seva anàlisi s'ha dut a terme per cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció UV-Vis. La correcta separació dels quatre compostos fenòlics té lloc en condicions isocràtiques amb una fase mòbil composta d'acetonitril i aigua en proporció 50:50 (v/v) amb un 1% d'àcid acètic. El flux de fase mòbil és d'1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ i el temps necessari per analitzar cada mostra és de 12 minuts. La detecció es realitza amb un detector de díodes en línia a 275 nm per a tots els compostos excepte 2,4-diclorofenol que es detecta a 286 nm. El volum de mostra injectat en cada cas és de 20 μL .

5.2.3.2 Estudis d'adsorció

En els estudis d'adsorció s'ha de diferenciar entre els experiments cinètics i la determinació de les isoterms d'adsorció. Els primers ens proporcionen informació del temps necessari per a que el sistema sòl-solució assoleixi l'equilibri, mentre que els segons avaluen el comportament del sistema davant de concentracions creixents del compost o compostos estudiats.

5.2.3.2.1 Cinètiques d'adsorció

Es pesen porcions de 3 grams de sòl en tubs de centrifuga (de vidre) i es deixen equilibrar durant unes 12 hores amb 10 mL de solució de clorur de calci 0.01M. Passat aquest temps, s'afegeix als tubs 5 mL d'una solució que conté els quatre derivats fenòlics a una concentració aproximada de $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en CaCl_2 0.01M. De nou es posen a agitar durant temps variables, entre 30 minuts i 72 hores. Passat el temps d'agitació pre-establert per a cada un dels tubs (experiments per duplicat per a cada temps), aquests es centrifuguen a $2\cdot 10^4$ rpm i els sobrenedants es filtren a través d'un filtre de xeringa d'acetat de cel·lulosa de $0.45 \mu\text{m}$. Les mostres s'analitzen emprant el mètode de cromatografia líquida descrit anteriorment.

5.2.3.2.2 Isotermes d'adsorció

Tots els experiments s'han dut a terme conforme a les normes de la OCDE [44]. Segons aquesta norma, és convenient utilitzar una relació sòl-solució que proporcioni un percentatge d'adsorció com a mínim del 20%, i preferiblement superior al 50%, per tal de minimitzar l'error en els càlculs. Es decideix treballar amb una relació 1:2 per a tots els compostos excepte per a 2,4-diclorofenol amb el que s'utilitza una relació 1:5 atesa la gran afinitat del sòl per aquest compost. Així, per a Ph, 2CP i 2NP es pesen porcions de 5 grams de sòl les quals s'equilibren amb 5 mL de solució de CaCl_2 0.01M mentre que per a 24DCP el pes de sòl és de 3 grams i la solució de CaCl_2 0.01M de 10 mL; passat el temps d'equilibració, s'afegeix el volum de solució stock del fenol corresponent ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per a Ph, 2CP i 2NP i $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per a 24DCP) necessari per obtenir concentracions en la suspensió sòl-solució d'entre 5 i $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, afegint-se clorur càlcic 0.01M fins aconseguir un volum final de 10 mL per a les isotermes de Ph, 2CP i 2NP i 15 mL per al cas del 24DCP. Els tubs s'agiten durant el temps necessari per assolir l'equilibri (determinat prèviament als estudis cinètics). Un cop assolit l'equilibri, es centrifuguen els tubs, es filtren els sobrenedants i s'analitzen per cromatografia líquida.

5.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Aquest capítol està dedicat a l'estudi de l'adsortivitat de quatre compostos fenòlics (fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol i 2,4-diclorofenol) en sòls de diferents característiques. Es vol determinar les característiques del sòl i dels adsorbats que més influeixen en les capacitats d'adsorció dels sòls pels compostos estudiats, per tal de predir el seu comportament un cop abocats al medi natural.

5.3.1 Caracterització del mètode cromatogràfic

El mètode cromatogràfic descrit en el **capítol 2** s'ha modificat lleugerament per a la seva utilització en la separació i determinació de Ph, 2CP, 2NP i 24DCP.

La fase mòbil més adient per tal de dur a terme la separació cromatogràfica dels quatre compostos fenòlics d'interès en aquest cas consisteix en una mescla acetonitril:aigua 50:50 (v/v) que conté un 1% d'àcid acètic. Proporcions inferiors d'acetonitril resulten en un augment en els temps de retenció dels anàlits ja que la disminució en la quantitat de CH₃CN a la fase mòbil provoca un augment de la seva polaritat i els anàlits, sobretot els més apolars (2NP i 24DCP), passen a tenir més afinitat per la fase estacionària i són arrossegats més lentament per la fase mòbil. L'augment de la quantitat d'acetonitril no es tradueix en una disminució considerable en els temps de retenció, pel que s'opta per treballar amb la relació CH₃CN:H₂O 50:50 (v/v).

El flux de fase mòbil utilitzat és d'1 mL·min⁻¹ i el volum de mostra en cada injecció és de 20 µL. Pel que fa a la detecció, una longitud d'ona de 275 nm resulta ser la més sensible per a tots els compostos estudiats excepte per a 24DCP que presenta una major sensibilitat a 286 nm, tot i que es pot detectar a 275 nm. La **Figura 5.2** mostra un exemple d'un cromatograma obtingut a partir de les condicions seleccionades.

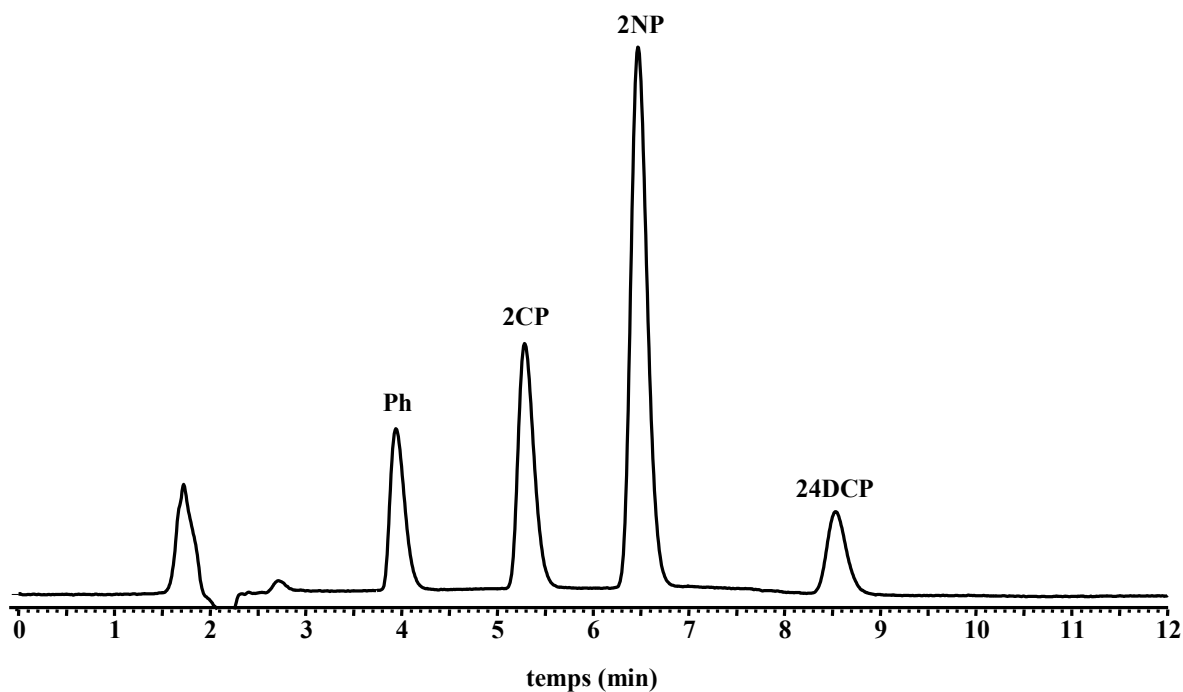


Figura 5.2 Cromatograma obtingut per a un patró dels quatre compostos fenòlics a un nivell de concentració d'1 mg·L⁻¹ en medi CaCl₂ 0.01M ($\lambda = 275$ nm).

El mètode cromatogràfic s'ha caracteritzat respecte als intervals de linealitat, límits de detecció i repetibilitat. L'interval de linealitat del mètode s'ha estudiat en medi CaCl₂ 0.01M fins a 100 mg·L⁻¹ (**Taula 5.2**) essent aquest lineal en tot el rang estudiat. No obstant, per a la quantificació de les mostres més diluïdes s'han utilitzat calibratges amb un rang de concentracions menor per minimitzar els errors associats.

| | pendent ($\cdot 10^{-4}$) | ordenada origen ($\cdot 10^{-4}$) | r^2 |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------|
| Ph | 9.92 ± 0.09 | 6.5 ± 4.7 | 0.9998 |
| 2CP | 10.75 ± 0.07 | 9.1 ± 3.9 | 0.9997 |
| 2NP | 30.6 ± 0.1 | 7.3 ± 4.7 | 0.9999 |
| 24DCP | 9.54 ± 0.04 | 5.5 ± 2.1 | 0.9999 |

Taula 5.2 Paràmetres de caracterització del mètode cromatogràfic (n=7).

Els límits de detecció del mètode s'han determinat per mitjà de la injecció dels anàlits en el sistema a concentracions cada cop més baixes fins trobar aquella en que l'alçada de pic és, com a mínim, tres vegades el soroll de fons del cromatograma al voltant del pic. Atenent a

aquesta consideració, es determina una concentració de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ com a límit de detecció per a Ph, 2CP i 2NP i 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per a 24DCP.

Per avaluar la repetibilitat del mètode cromatogràfic s'han realitzat sis injeccions consecutives d'un patró que conté els quatre compostos estudiats a una concentració d'1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Els valors de desviació estàndard relativa (RSD) obtinguts es mostren a la **Taula 5.3**. D'aquests valors es dedueix que el senyal es manté estable al llarg d'una sessió de treball. També s'ha avaluat la reproductibilitat realitzant punxades del mateix patró indicat anteriorment en dos dies consecutius i els valors de RSD també es poden veure a la **Taula 5.3**. Els resultats obtinguts en els dos casos són similars pel que podem concloure que el mètode cromatogràfic desenvolupat és suficientment precís.

| | n=6 (1 dia) | n=9 (2 dies) |
|--------------|--------------------|---------------------|
| | RSD (%) | RSD (%) |
| Ph | 0.6 | 0.5 |
| 2CP | 0.3 | 0.3 |
| 2NP | 0.6 | 0.6 |
| 24DCP | 0.4 | 0.5 |

Taula 5.3 Estudis de repetibilitat i reproductibilitat del mètode cromatogràfic realitzats amb una solució estàndard dels quatre fenols de concentració 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.3.2 Estudis d'adsorció

Es vol determinar l'adsorció de compostos fenòlics amb diferent grau i tipus de grups funcionals en sòls de diferent procedència. S'han escollit sis sòls representatius de les comarques de Girona amb atributs molt diferenciats entre ells. El primer que s'ha dut a terme és una caracterització completa de les mostres de sòl pel que fa a les seves propietats físiques i químiques, la qual es recull a la **Taula 5.4**. Tal com podem veure, són sòls amb valors molt diversos de pH, fraccions d'argila, sorra i llim, percentatge de matèria orgànica i capacitat de canvi catiònic, entre d'altres. Aquestes diferències es poden observar a simple vista a través de la textura i el color de cadascuna de les mostres.

Un cop feta la presa de mostra de sòls, tots ells de l'horitzó més superficial, s'assequen a temperatura ambient i es tamisen a una mida de partícula igual o inferior a 2 mm. Tots els experiments d'adsorció s'han dut a terme amb aquesta fracció, tal com indica la norma OCDE [44].

| | SÒLS ESTUDIATS | | | | | |
|--|----------------|----------|-----------|----------|---------|------------|
| | Vilaüt | Pedret | Vilajuïga | Cadaqués | Orfes | St. Dalmai |
| ús majoritari | pastura | agrícola | vinya | pastura | pastura | cultiu |
| densitat aparent (g·cm⁻³) | 1.57 | 1.43 | 1.37 | 1.96 | 1.59 | 1.25 |
| capacitat infiltració (mm·h⁻¹) | 224 | 17.04 | 165.20 | 9.06 | 21.25 | 126.55 |
| capacitat de retenció hídrica (%) | 74.45 | 47.70 | 25.83 | 48.66 | 43.25 | 53.18 |
| argila | 52.35 | 55.71 | 4.32 | 8.61 | 15.65 | 34.15 |
| Llim | 39.85 | 31.08 | 14.85 | 17.06 | 25.19 | 25.19 |
| sorres | 7.80 | 13.21 | 80.83 | 74.34 | 59.43 | 40.66 |
| PH | 6.95 | 8.03 | 5.17 | 5.78 | 8.18 | 6.55 |
| conductivitat elèctrica (dS·m⁻¹) | 2.40 | 0.16 | 0.08 | 0.11 | 0.24 | 0.28 |
| carbonats (%) | 6.75 | 12.15 | 0.0 | 0.0 | 19.13 | 0.0 |
| matèria orgànica (%) | 6.70 | 0.98 | 0.60 | 4.10 | 0.83 | 8.11 |
| nitrogen total (%) | 0.65 | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.17 | 0.33 |
| C/N | 5.97 | 6.31 | 6.96 | 6.31 | 2.83 | 14.25 |
| capacitat canvi catiònic (meq/100g) | 63.70 | 21.30 | 8.83 | 13.60 | 19.40 | 31.35 |
| Ca (meq/100g) | 49.90 | 14.21 | 4.63 | 5.29 | 16.86 | 6.33 |
| Mg (meq/100g) | 10.64 | 4.64 | 2.67 | 1.55 | 3.17 | 4.33 |
| K (meq/100g) | 3.32 | 0.42 | 1.03 | 1.42 | 0.52 | 1.52 |
| Na (meq/100g) | 2.50 | 0.83 | 0.55 | 2.83 | 0.67 | 1.67 |
| saturació bases (%) | 104 | 94 | 100 | 82 | 109 | 44 |
| P assimilable (mg·Kg⁻¹) | 32.68 | 26.68 | 32.40 | 38.91 | 28.15 | 38.15 |

Taula 5.4 Caracterització fisicoquímica dels sòls utilitzats en l'estudi d'adsorció.

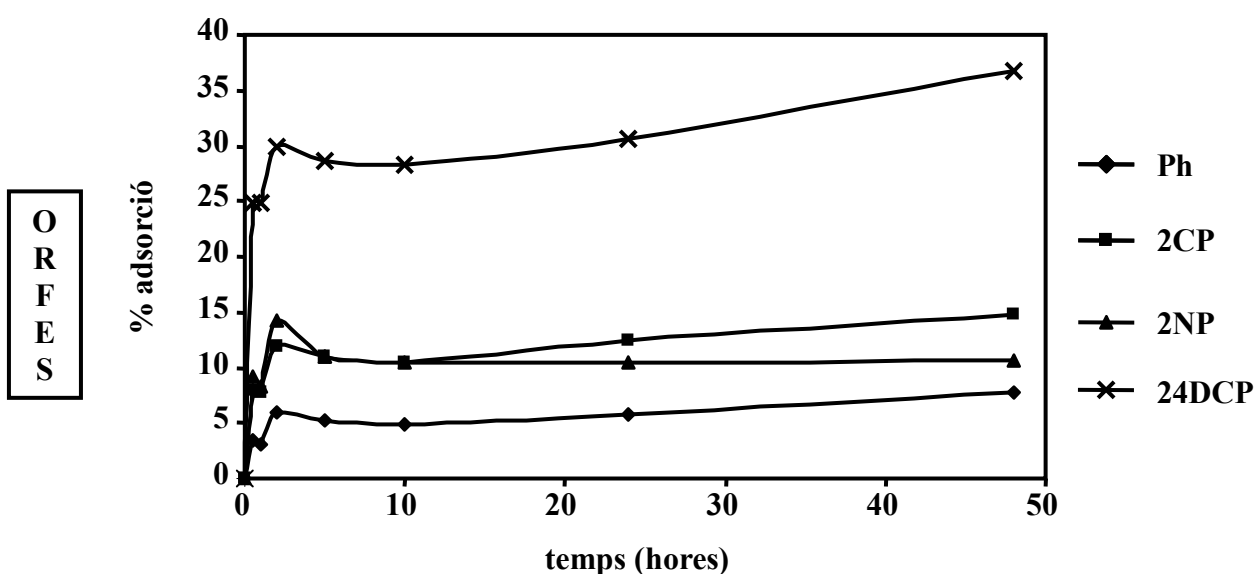
5.3.2.1 Estudis preliminars

Abans de dur a terme els estudis d'adsorció és necessari realitzar una sèrie de tests per determinar el temps que ha de transcórrer perquè el sistema sòl:solució assoleixi l'equilibri, la relació sòl-solució més adient en cada cas, així com estudis d'adsorció dels anàlits a les parets dels recipients on es realitzen els assaigs i proves sobre el sòl per determinar la presència d'artefactes que puguin interferir a l'anàlisi cromatogràfica de les substàncies estudiades.

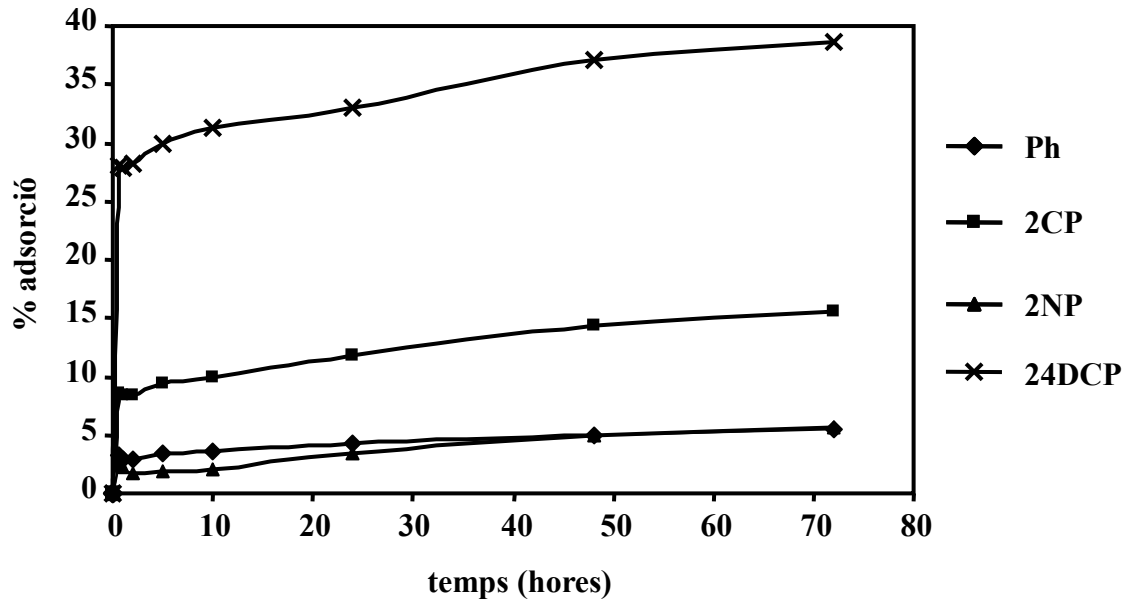
5.3.2.1.1 Cinètiques d'adsorció

Els estudis cinètics ens permeten determinar el temps necessari per a que els sistemes sòl-solució assoleixin l'equilibri. Per tal de dur a terme aquests assaigs es posen en contacte diferents porcions de sòl amb una solució que conté els quatre anàlits i s'agiten les mescles durant diferents temps (0.5, 1, 2, 5, 10, 24, 48 i 72 hores), tal com es descriu a la secció experimental.

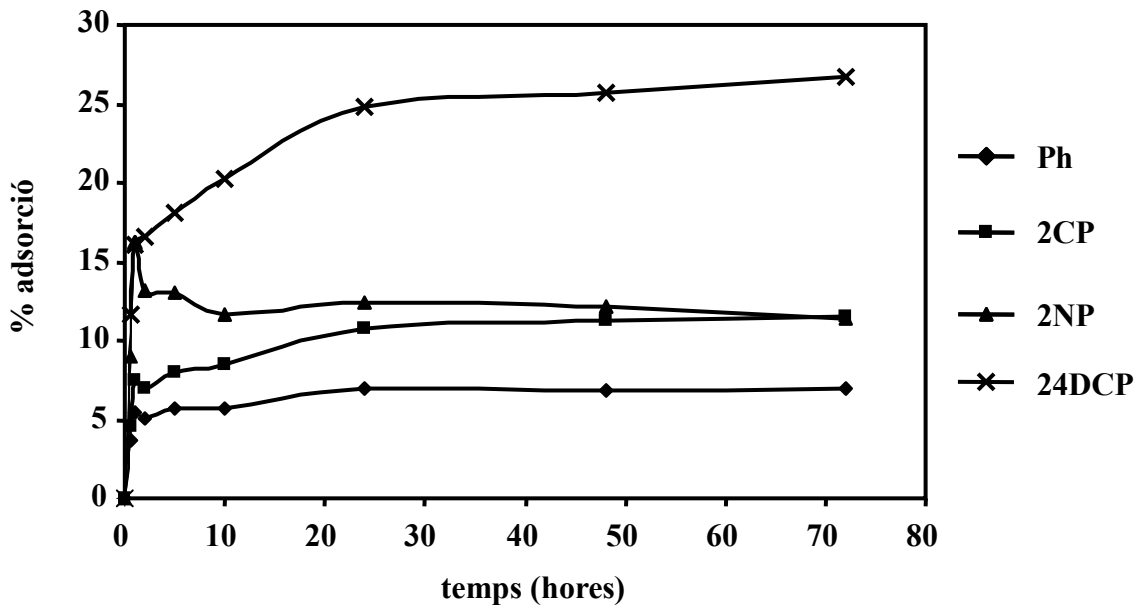
Les cinètiques es poden representar de dues maneres diferents; per una banda el percentatge d'anàlit adsorbit al sòl en funció del temps d'equilibració, i per una altra el percentatge d'anàlit que resta en solució en funció del temps. Els gràfics de la **Figura 5.3** representen les cinètiques d'adsorció, representades com al percentatge d'anàlit adsorbit en funció del temps de contacte sòl-solució, per a cada compost en cadascun dels sòls estudiats.



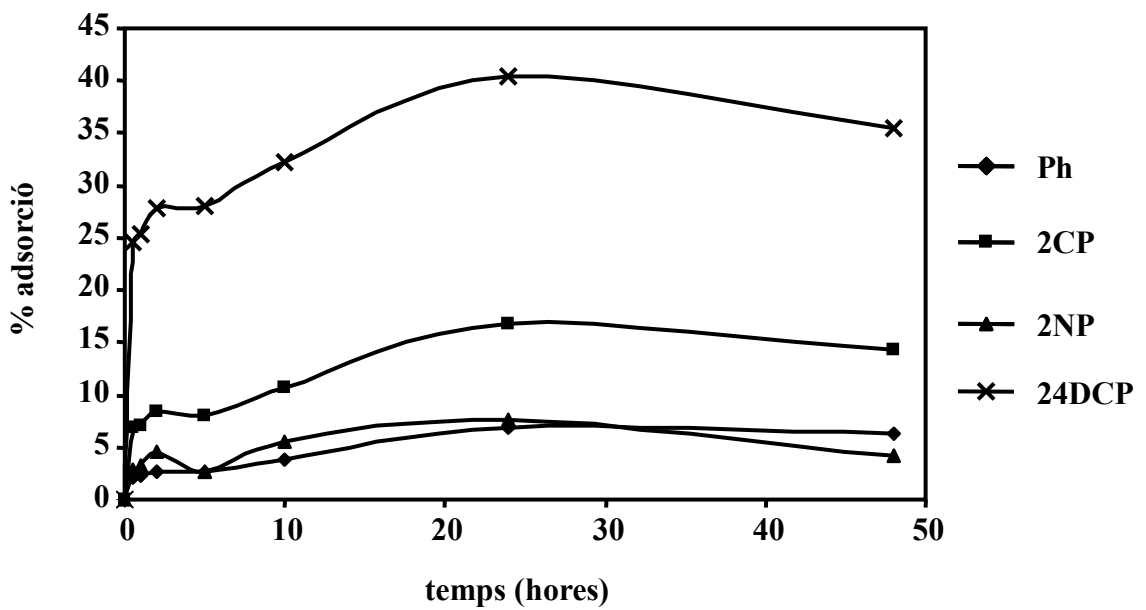
V
I
L
L
A
Ü
T



V
I
L
L
A
J
U
Ï
G
A



P
E
D
R
E
T



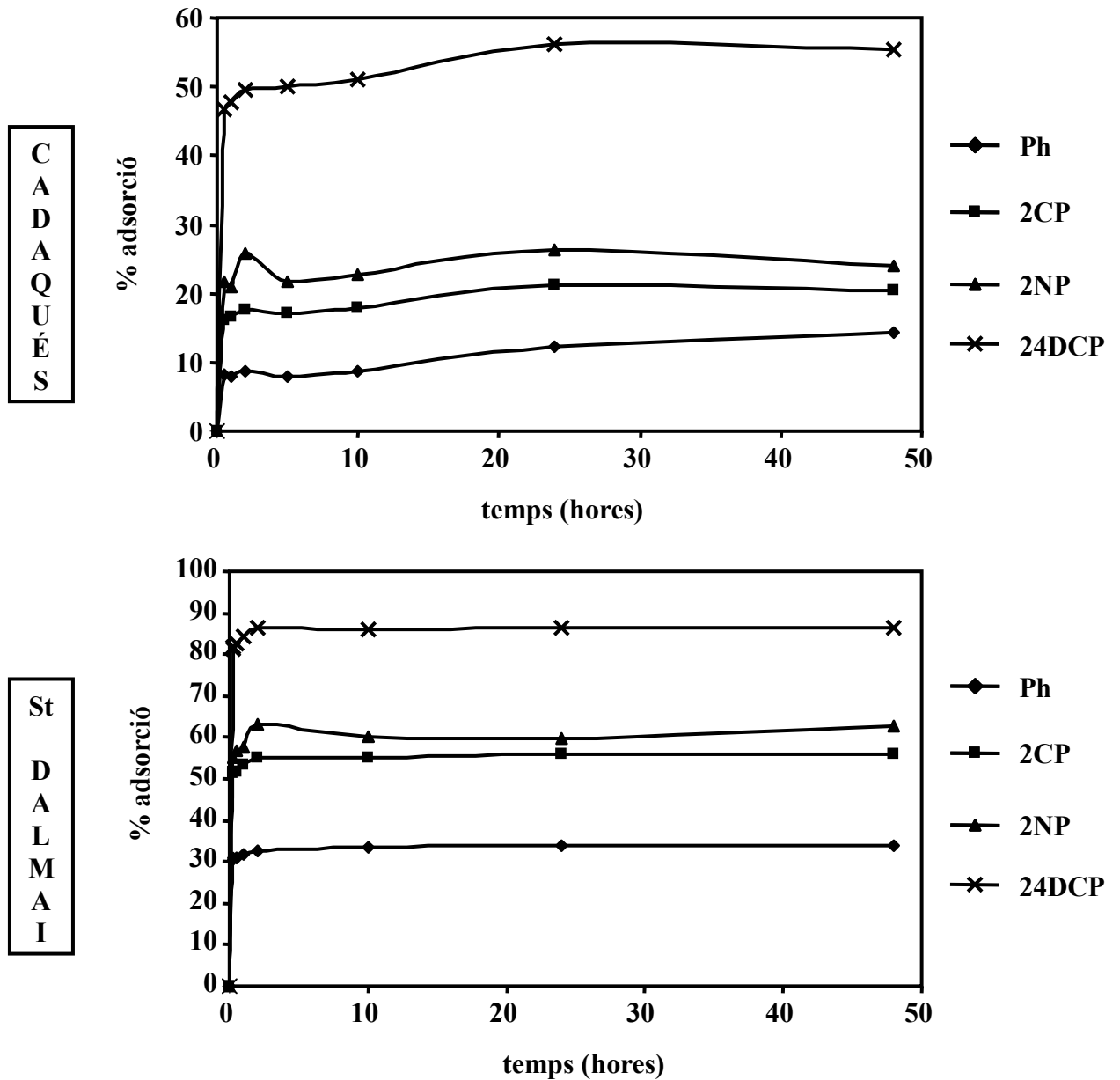


Figura 5.3 Gràfics corresponents a les cinètiques d'adsorció de cada fenol en cadascun dels sis sòls estudiats (concentració inicial: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; relació sòl:solució 1:5).

Tal com es pot veure, la cinètica d'adsorció varia lleugerament en funció del sòl. En general, un temps de contacte de 24 hores és suficient per arribar a l'estat d'equilibri, excepte per al sòl de Vilaüt, on després de 24 hores encara hi ha un lleuger increment del percentatge d'adsorció a mesura que s'incrementa el temps. Es decideix treballar amb un temps de 24 hores en la determinació de les isoterms d'adsorció ja que per a la majoria dels sòls s'ha assolit l'equilibri en aquest temps. Per al sòl de Vilaüt, on no s'ha assolit l'equilibri a les 24

hores, les variacions passat aquest temps son escasses i es pot assumir que es troben dins l'error experimental del mètode emprat per a la determinació.

L'ordre d'adsorció dels compostos avaluats és similar per a tots els sòls. El compost que presenta una retenció més gran és el 24DCP, mentre que el 2CP i el 2NP tenen nivells d'adsorció similars. El compost menys retingut en tots els sòls és el fenol (compost més polar).

5.3.2.1.2 Selecció de la relació sòl:solució

La selecció de la relació sòl:solució més apropiada és important a l'hora de dur a terme estudis d'adsorció. La quantitat de solut adsorbida al sòl a l'equilibri habitualment es calcula per diferència entre la quantitat inicial i la que resta en solució. El resultat d'aquesta diferència no convé que sigui molt petit per tal de minimitzar els errors produïts en el càlcul. D'altra banda, sobretot en els casos en els que s'assoleixen percentatges elevats d'adsorció, tampoc convé que les concentracions d'adsorbat a la solució a l'equilibri siguin molt petites i pròximes als límits de quantificació del mètode de detecció per, igualment, minimitzar els errors associats a les mesures. Les normes de l'OCDE [44] recomanen que el percentatge adsorbit es trobi per sobre del 20%, preferiblement superior al 50%, i aconsellen dur a terme un seguit de proves prèvies amb tots els anàlits i sòls de diferents característiques a estudiar per tal de trobar les condicions òptimes de treball. Donat que la norma estableix una relació sòl:solució 1:5 com un bon punt de partida, els primers experiments s'han realitzat amb aquesta proporció (3 grams de sòl amb 15 mL de solució). Amb aquesta relació, el 2,4-diclorofenol, que és el compost que s'adsorbeix en major proporció a tots els sòls, presenta uns percentatges de retenció entre 30 i 80%. Així, una relació sòl:solució 1:5 és apropiada per tal de dur a terme els estudis amb aquest compost. Per contra, la resta de fenols estudiats, tot i presentar una adsorció adequada, entre el 30 i el 60%, per al sòl amb major contingut en matèria orgànica (St. Dalmai), l'adsorció és inferior al 10% en altres sòls, pel que es decideix provar una relació sòl:solució 1:2 (5 grams de sòl amb 10 mL de solució). Aquesta altra relació ha donat com a resultat percentatges d'adsorció adients per a 2CP, 2NP i Ph en tots els sòls. Així doncs, els estudis s'han dut a terme amb una relació 1:5 (3 grams de sòl i 15 mL de solució total) per a 2,4-diclorofenol i amb una relació 1:2 (5 grams de sòl i 10 mL de solució total) per a fenol, 2-clorofenol i 2-nitrofenol.

S'ha de precisar que els percentatges d'adsorció assolits per als compostos fenòlics estudiats presenten variacions en funció de si s'analitzen conjuntament o per separat degut a fenòmens de competència. En aquest treball s'han determinat les isoterms d'adsorció en situació de no competència, és a dir, portant a terme el procés per a cada compost individual en els sis sòls avaluats.

5.3.2.1.3 Assaigs de control

Aquests assaigs consisteixen en determinar si el procés condueix a pèrdues dels anàlits per adsorció al material utilitzat (i.e., a les parets de vidre dels tubs), i també per detectar si els sòls estudiats contenen substàncies que ens poden interferir en el procés d'anàlisi o bé si ja es troben contaminats amb els compostos fenòlics estudiats.

Per al primer dels casos s'utilitzen mostres control que contenen únicament la substància estudiada en cada cas sense el sòl i aquestes són sotmeses a tot el procés. Aquestes proves, a més de detectar possibles pèrdues dels anàlits per adsorció sobre el material de vidre, també ens serveixen per avaluar la seva estabilitat en el medi, CaCl_2 0.01M. Els resultats obtinguts mostren que no es pateixen pèrdues de cap dels anàlits i que aquests són estables en el medi d'estudi.

Per al segon cas, es realitzen blancs dels sòls on les suspensions emprades contenen el sòl i CaCl_2 0.01M però sense la presència de cap dels anàlits. Igualment es sotmeten les mescles a tot el procés. S'ha portat a terme un blanc per a cada sòl i en cap cas s'han detectat els fenols estudiats ni substàncies amb temps de retenció similars que ens podrien interferir en la seva anàlisi cromatogràfica.

5.3.2.2 Isoterms d'adsorció

En els equilibris d'adsorció s'estudia la relació entre la capacitat d'adsorció i la concentració d'anàlit lliure. Aquesta relació, mesurada a temperatura constant, dona lloc a les anomenades isoterms d'adsorció.

S'han ajustat les dades d'adsorció obtingudes per als quatre compostos fenòlics, utilitzant els sis sòls mostrejats, a tres dels models matemàtics proposats com a expressió de les isoterms d'adsorció: el model d'isoterma lineal, el model de Freundlich i el model de Langmuir. Els dos últims són els models més utilitzats per fer l'ajust de les dades obtingudes, tant en sistemes sòlid-líquid com sòlid-gas. Aquests models representen, en el cas concret

d'estudi, la relació entre la quantitat de compost fenòlic adsorbida en el sòlid adsorbent (q , en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i la concentració de compost fenòlic en solució (C_{eq} , en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), una vegada s'ha assolit l'equilibri. L'interval de concentracions estudiat per a cada un dels compostos és de 5 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Amb l'ajust de les dades experimentals als models matemàtics proposats s'han obtingut, en cada cas, els valors dels paràmetres de l'equació utilitzada (**Taula 5.5**).

| | FREUNDLICH | | | LANGMUIR | | | LLEI de HENRY | |
|-------------------|------------|-------|----------------|------------------|---------|----------------|----------------|----------------|
| | K | 1/n | r ² | Q _{max} | b | r ² | K _H | r ² |
| VILAÜT | | | | | | | | |
| Ph | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2CP | 3,741 | 0,680 | 0,998 | 130,406 | 0,014 | 0,992 | 0,950 | 0,980 |
| 2NP | 1,825 | 0,686 | 0,996 | 72,699 | 0,012 | 0,988 | 0,446 | 0,984 |
| 24DCP | 8,304 | 0,739 | 0,998 | 418,628 | 0,011 | 0,998 | 2,752 | 0,986 |
| PEDRET | | | | | | | | |
| Ph | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2CP | 6,783 | 0,636 | 0,986 | 147,575 | 0,024 | 0,980 | 1,533 | 0,956 |
| 2NP | 2,582 | 0,813 | 0,992 | 242,9 | 0,007 | 0,992 | 1,163 | 0,986 |
| 24DCP | 8,117 | 0,779 | 0,988 | 638,216 | 0,007 | 0,980 | 3,210 | 0,984 |
| VILAJUÏGA | | | | | | | | |
| Ph | 0,579 | 0,778 | 0,976 | 51,385 | 0,007 | 0,978 | 0,208 | 0,990 |
| 2CP | 1,182 | 0,859 | 0,980 | 176,143 | 0,005 | 0,984 | 0,644 | 0,974 |
| 2NP | 2,623 | 0,657 | 0,954 | 87,563 | 0,014 | 0,947 | 0,559 | 0,929 |
| 24DCP | 3,040 | 0,853 | 0,988 | 626,906 | 0,003 | 0,986 | 1,582 | 0,988 |
| CADAQUÉS | | | | | | | | |
| Ph | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2CP | 6,471 | 0,685 | 0,984 | 197,729 | 0,018 | 0,984 | 1,825 | 0,964 |
| 2NP | 9,170 | 0,601 | 0,947 | 148,317 | 0,034 | 0,958 | 1,791 | 0,891 |
| 24DCP | 9,950 | 0,904 | 0,996 | 2615,267 | 0,003 | 0,996 | 6,844 | 0,996 |
| ORFES | | | | | | | | |
| Ph | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2CP | 3,446 | 0,692 | 0,988 | 129,044 | 0,014 | 0,986 | 0,926 | 0,968 |
| 2NP | 0,798 | 1,052 | 0,984 | -305,481 | -0,0027 | 0,986 | 0,972 | 0,984 |
| 24DCP | 9,475 | 0,697 | 0,955 | 326,518 | 0,016 | 0,964 | 2,618 | 0,924 |
| St. DALMAI | | | | | | | | |
| Ph | 7,340 | 0,762 | 0,992 | 526,910 | 0,008 | 0,984 | 2,640 | 0,986 |
| 2CP | 11,054 | 0,892 | 0,996 | 1689,792 | 0,005 | 0,996 | 7,443 | 0,992 |
| 2NP | 10,219 | 1,050 | 0,986 | -1977,472 | -0,005 | 0,988 | 11,691 | 0,984 |
| 24DCP | 52,485 | 0,870 | 0,992 | 2097,873 | 0,023 | 0,990 | 38,027 | 0,988 |

Taula 5.5 Paràmetres de caracterització dels models de Freundlich, Langmuir i isoterma lineal obtinguts en els estudis d'adsorció de compostos fenòlics.

A la **Taula 5.5** podem veure que s'obtenen bons ajustos de les dades experimentals per als tres models matemàtics estudiats. La **Figura 5.4** mostra les isoterms d'adsorció corresponents als quatre fenols per al sòl de Pedret.

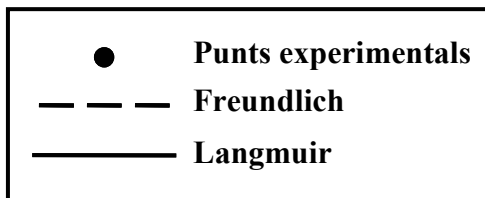
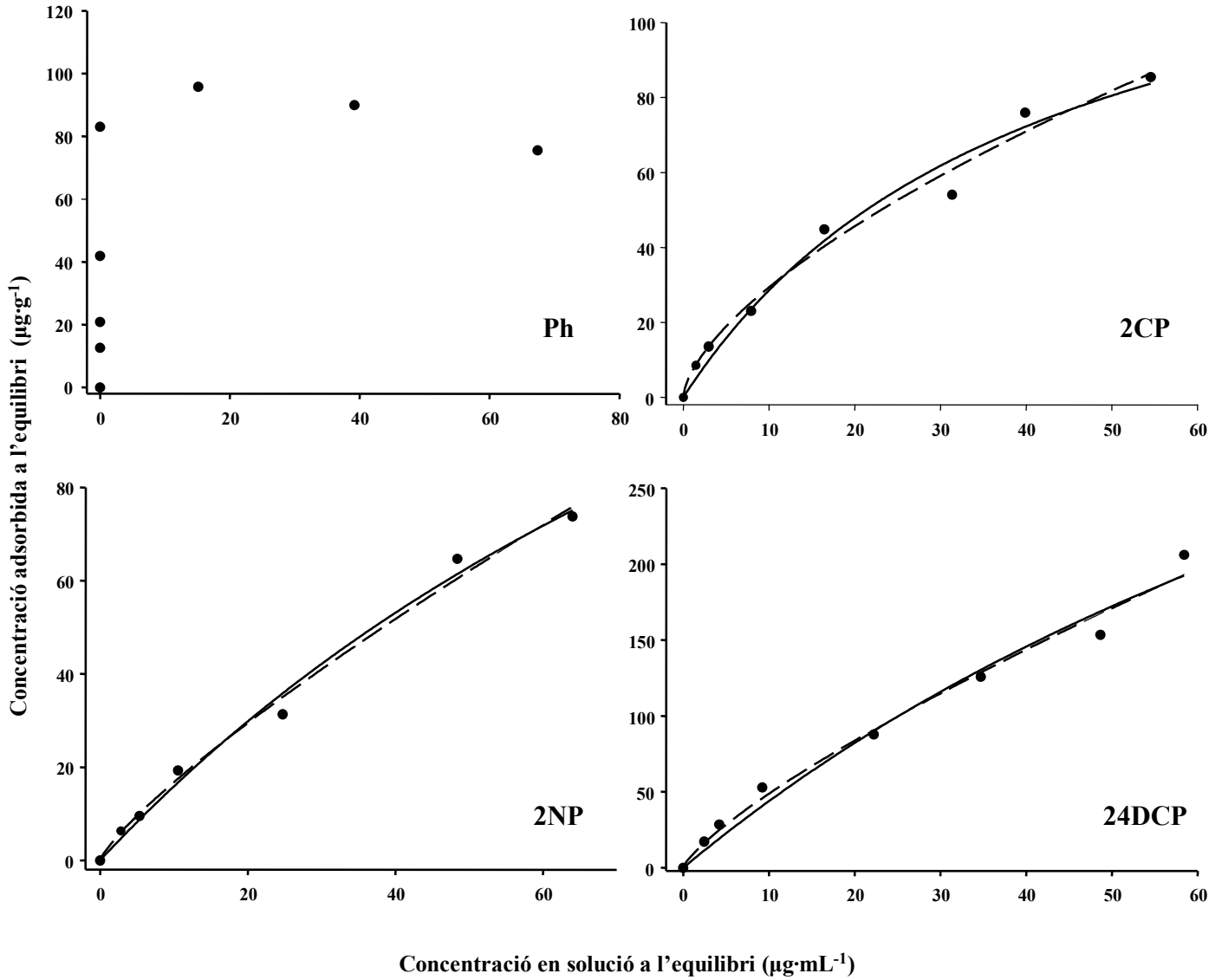


Figura 5.4 Ajust de les dades experimentals a les isoterms de Freundlich i de Langmuir per a Ph, 2CP, 2NP i 24DCP en el sòl de Pedret.

Els gràfics del fenol per a aquest sòl i per als sòls de Cadaqués, Vilaüt i Orfes segueixen el patró característic d'una isoterma de tipus H en la qual té lloc una adsorció completa d'anàlit a les concentracions més baixes fins a assolir la capacitat màxima. Aquest comportament és característic de la presència de fortes interaccions entre els punts actius del sòl i les molècules de fenol. En aquests casos no és possible l'ajust de les dades per cap dels tres models avaluats. Únicament podem determinar de forma gràfica la capacitat màxima d'adsorció d'aquest compost per a cadascun dels sòls, valors que es mostren a la **Taula 5.6**.

| Sòl | Capacitat d'adsorció màxima ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|-----------------|---|
| Pedret | 80 |
| Cadaqués | 214 |
| Vilaüt | 40 |
| Orfes | 60 |

Taula 5.6 Valors de capacitat d'adsorció màxima per a fenol determinats gràficament a partir de les isoterms d'adsorció.

La resta de compostos, 2-clorofenol, 2-nitrofenol i 2,4-diclorofenol, proporcionen bons ajusts de les dades experimentals a l'equació lineal, de Freundlich i de Langmuir. En general, la capacitat d'adsorció d'aquests anàlits és directament proporcional a la seva hidrofobicitat. Així, el 2,4-diclorofenol és el compost que més s'adsorbeix en tots els sòls estudiats. El 2-clorofenol és més hidrofòbic (apolar) que el 2-nitrofenol, no obstant, aquest últim proporciona valors de K i de Q_{max} superiors als de 2-clorofenol en alguns casos. L'adsorció de les substàncies fenòliques en els sòls té lloc, principalment, a través de la fracció húmica d'aquests últims. Les substàncies húmiques són estructures macromoleculares formades per una gran proporció d'anells aromàtics amb diferents tipus de funcionalitzacions. Aquestes parts aromàtiques poden interaccionar a través d'enllaços π - π amb els anells fenòlics. El grup nitro actua com un fort retirador de càrrega i, en conseqüència, redueix la densitat electrònica de l'anell aromàtic. Aquest fet permet que el 2-nitrofenol formi adductes més forts que el 2-clorofenol amb la matèria orgànica. Així, les capacitats d'adsorció obtingudes per a 2-nitrofenol poden ser anormalment elevades considerant només la seva hidrofobicitat.

S'ha dut a terme una anàlisi de components principals amb els valors de les propietats fisicoquímiques de cadascun dels sòls per tal d'observar si existeix alguna agrupació entre elles i poder determinar quines variables són les més importants a l'hora d'avaluar el

comportament dels sòls estudiats. D'aquesta anàlisi es conclou que les dades obtingudes es poden analitzar a partir de tres components principals que expliquen, respectivament, el 61.3 %, el 22.9 % i el 7.0 % de la variança total (globalment, un 91.2 %). La **Figura 5.5** reproduïx el gràfic dels *loadings* del primer factor respecte al segon factor principal.

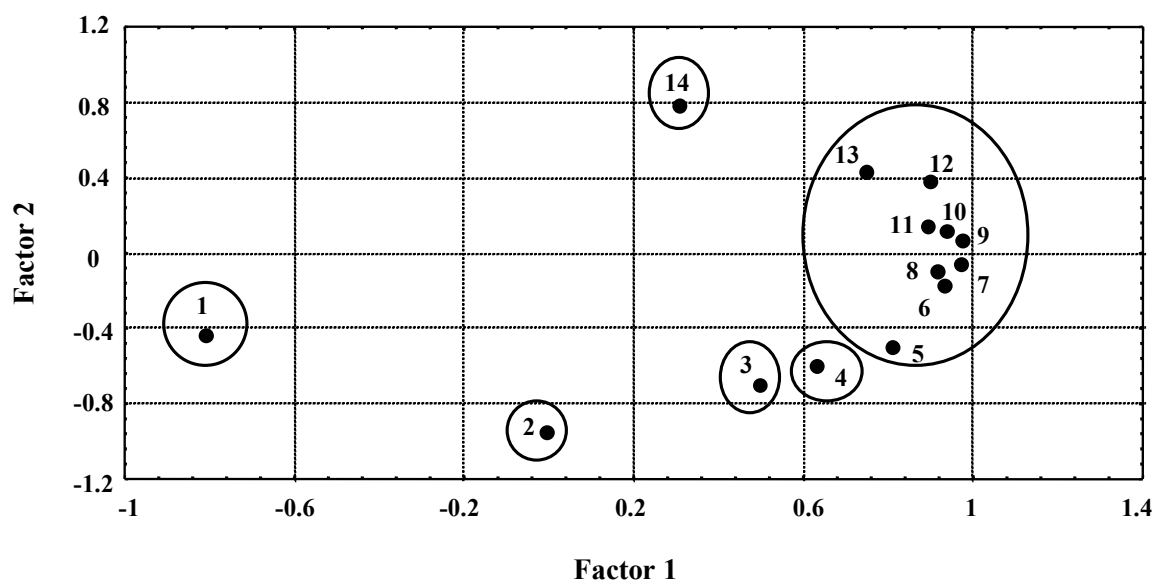


Figura 5.5 Representació gràfica de les agrupacions obtingudes per a les diferents propietats físico-químiques dels sòls estudiats (1, % sorra; 2, concentració de P; 3, concentració de Na; 4, % matèria orgànica; 5, concentració de K; 6, % N; 7, capacitat de canvi catiònic; 8, conductivitat elèctrica; 9, capacitat de retenció hídrica; 10, concentració de Mg; 11, concentració de Ca; 12, % llim; 13, % argila; 14, pH del sòl).

La visió conjunta dels gràfics corresponents a les relacions entre els tres factors principals obtinguts permet deduir que les variables s'agrupen en sis blocs, els quals es poden veure encerclats a la **Figura 5.5**. El dendograma de les distàncies Euclídees (**Figura 5.6**) permet veure amb més claredat l'agrupació formada per les variables concentració de potassi (K), percentatge d'argila (%ARG), percentatge de llim (%LLIM), conductivitat elèctrica (CONDELEC), concentració de calci (Ca), percentatge de nitrogen (%N), capacitat de canvi catiònic (CANVCAT), concentració de magnesi (Mg) i capacitat de retenció hídrica (CRETHID). Per tal d'avaluar les capacitats d'adsorció dels compostos fenòlics no cal utilitzar totes les variables sinó una variable de cada un dels blocs. La resta de variables es pot considerar que no donen informació rellevant i el percentatge de desviació estàndard explicat per aquestes dades és del mateix ordre que el soroll. Així, les variables que es poden utilitzar per avaluar les capacitats d'adsorció dels compostos fenòlics són el percentatge d'argila, el

pH, el percentatge de matèria orgànica (%MO), la concentració de sodi (Na), la concentració de fòsfor (P) i el percentatge de sorra (%SORRA).

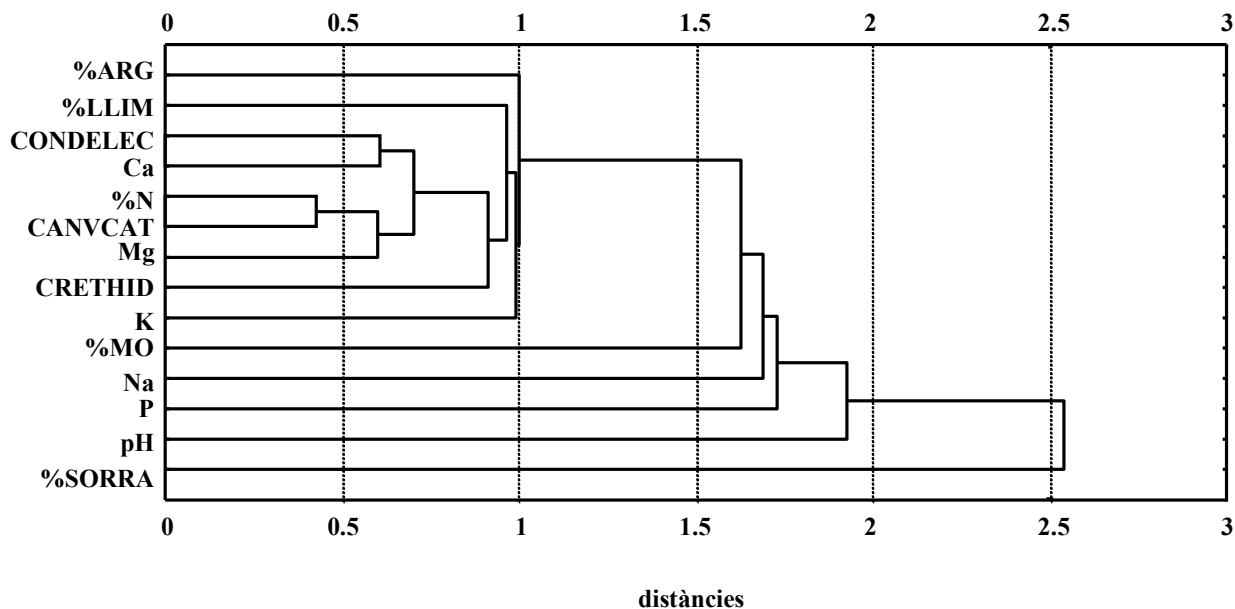
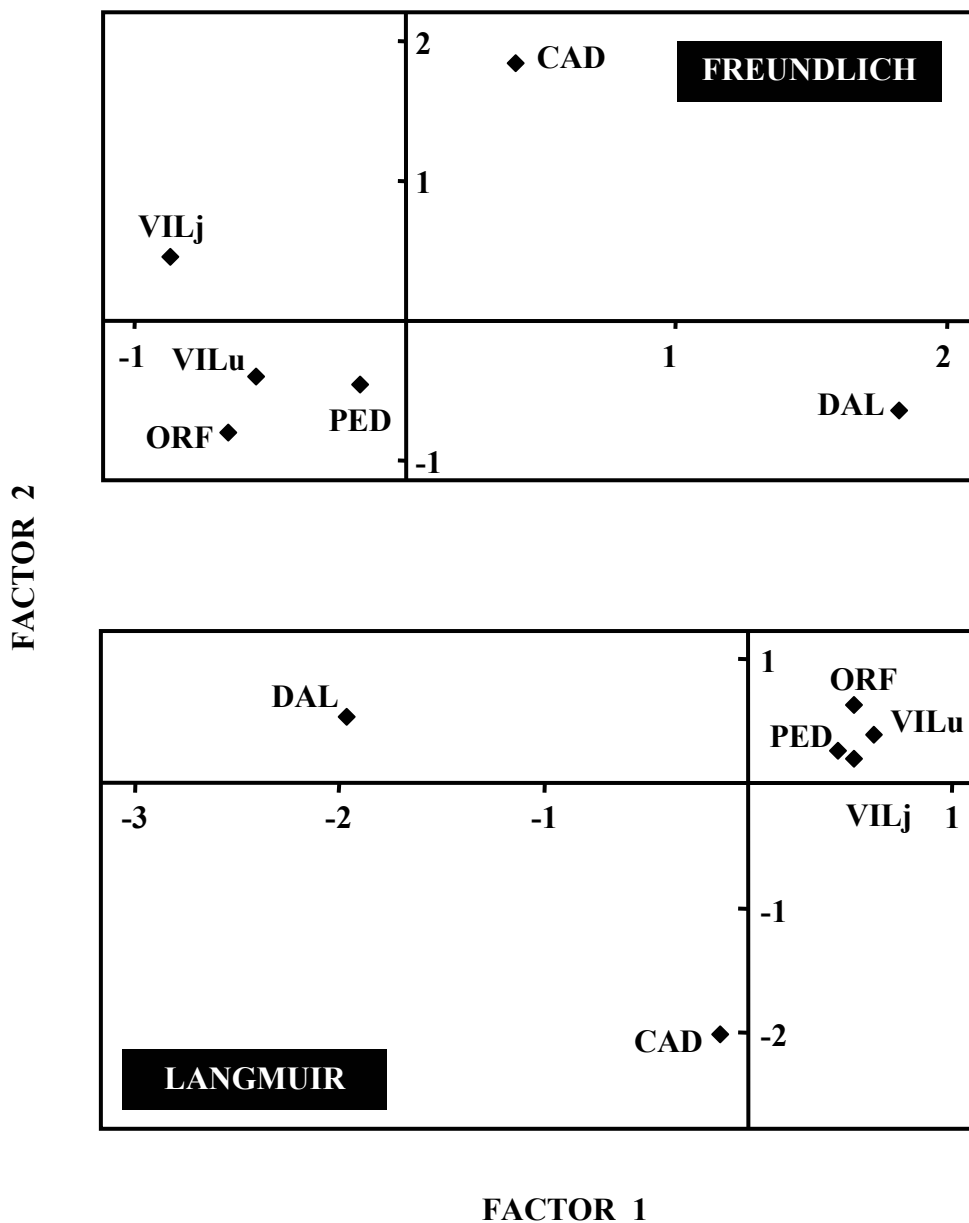


Figura 5.6 Dendrograma de les distàncies de les variables dels sòls estudiats.

Per avaluar la presència d'agrupacions als sòls avaluats, s'han dut a terme diferents anàlisis de components principals utilitzant com a variables les constants obtingudes amb els tres models utilitzats. En una primera anàlisi de components principals s'han utilitzat les constants d'adsorció (K) obtingudes amb l'equació de Freundlich, la segona anàlisi s'ha realitzat utilitzant les capacitats d'adsorció màxima (Q_{max}) de l'equació de Langmuir, i a la darrera anàlisi s'han fet servir les constants d'adsorció (K_H) de l'ajust de dades a l'equació lineal. Per a tots els casos s'han utilitzat les dades autoescalades. Per als tres casos s'han obtingut resultats equivalents i la variança de les dades s'explica amb dos factors principals (un 95.3 % de la variança total en el cas del model de Freundlich, un 99.7 % per al de Langmuir, i un 99.9 % per al Lineal). La **Figura 5.7** representa els gràfics corresponents als *scores* per a cadascun dels models. Aquestes representacions ens permeten observar com s'agrupen les mostres (sòls) en funció de les variables utilitzades. Per als models de Freundlich i de Langmuir, els sòls de Vilajuïga (VILj), Orfes (ORF), Vilaüt (VILu) i Pedret (PED) queden agrupats, mentre que el sòl de St. Dalmai (DAL) queda totalment allunyat de la resta i el sòl de Cadaqués (CAD) tampoc forma cap agrupació amb la resta de sòls. En el cas

del model lineal, el sòl de Cadaqués sembla apropar-se més i formar una agrupació amb els sòls de Vilajuïga, Orfes, Vilaüt i Pedret i el sòl de St. Dalmai es troba separat de la resta. No obstant, aquest model és el més inexacte dels tres i, per tant, es pot assumir que els resultats obtinguts a partir de l'ús de les constants de Freundlich i Langmuir son més correctes que l'obtingut amb el model lineal i que el sòl de Cadaqués no s'agrupa amb els altres. Aquestes tendències es poden veure més clarament a partir dels dendogrames de distàncies, els quals es representen a la **Figura 5.8**.



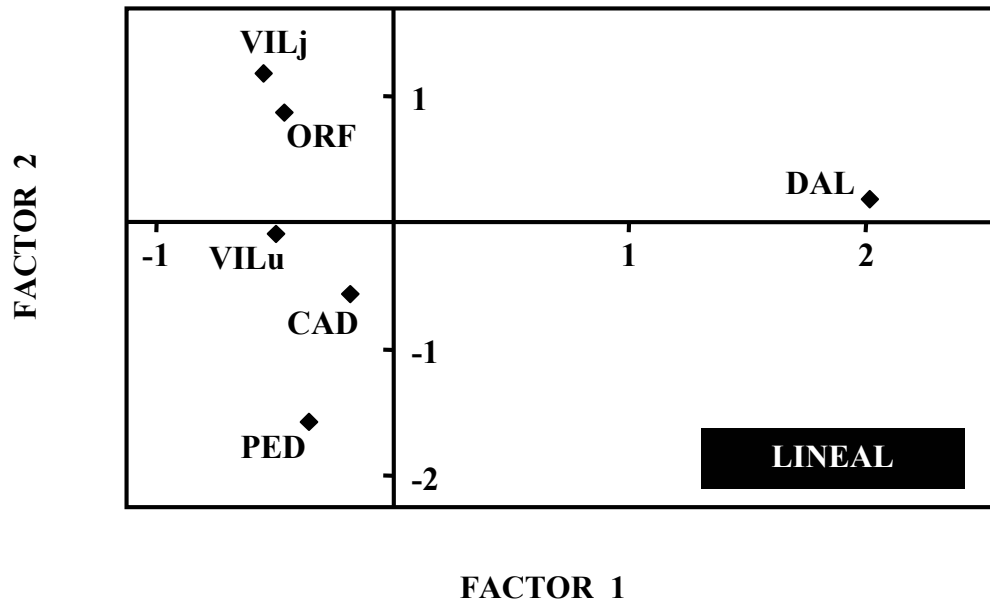
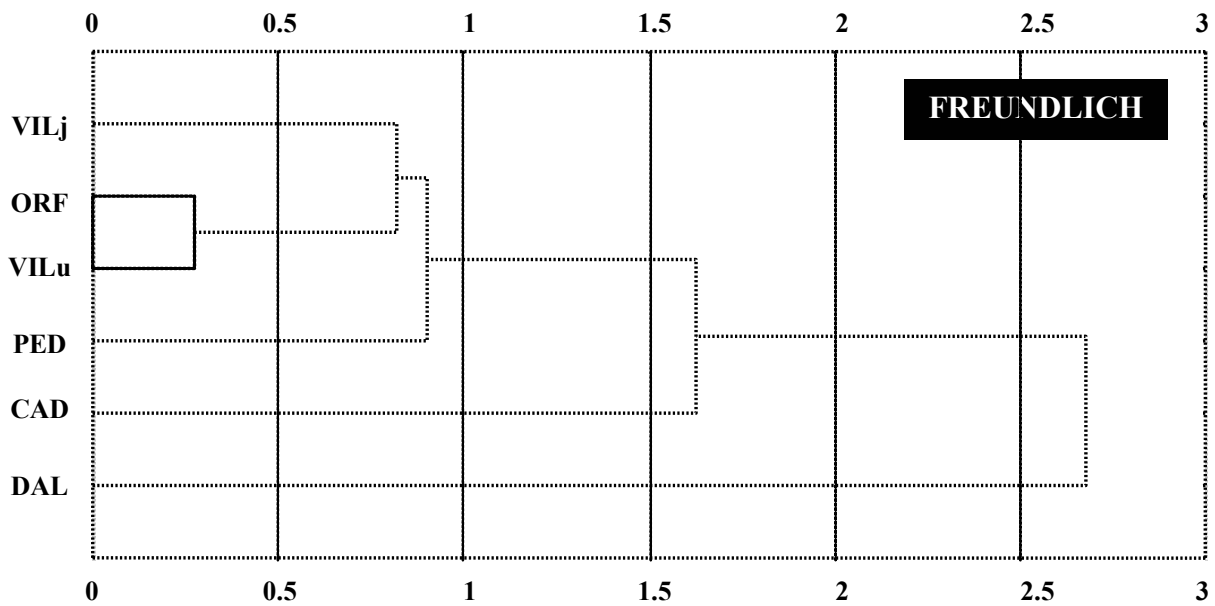


Figura 5.7 Representació gràfica de les agrupacions obtingudes per les mostres de sòl en funció dels paràmetres d'adsorció obtinguts en l'ajust de les dades experimentals.



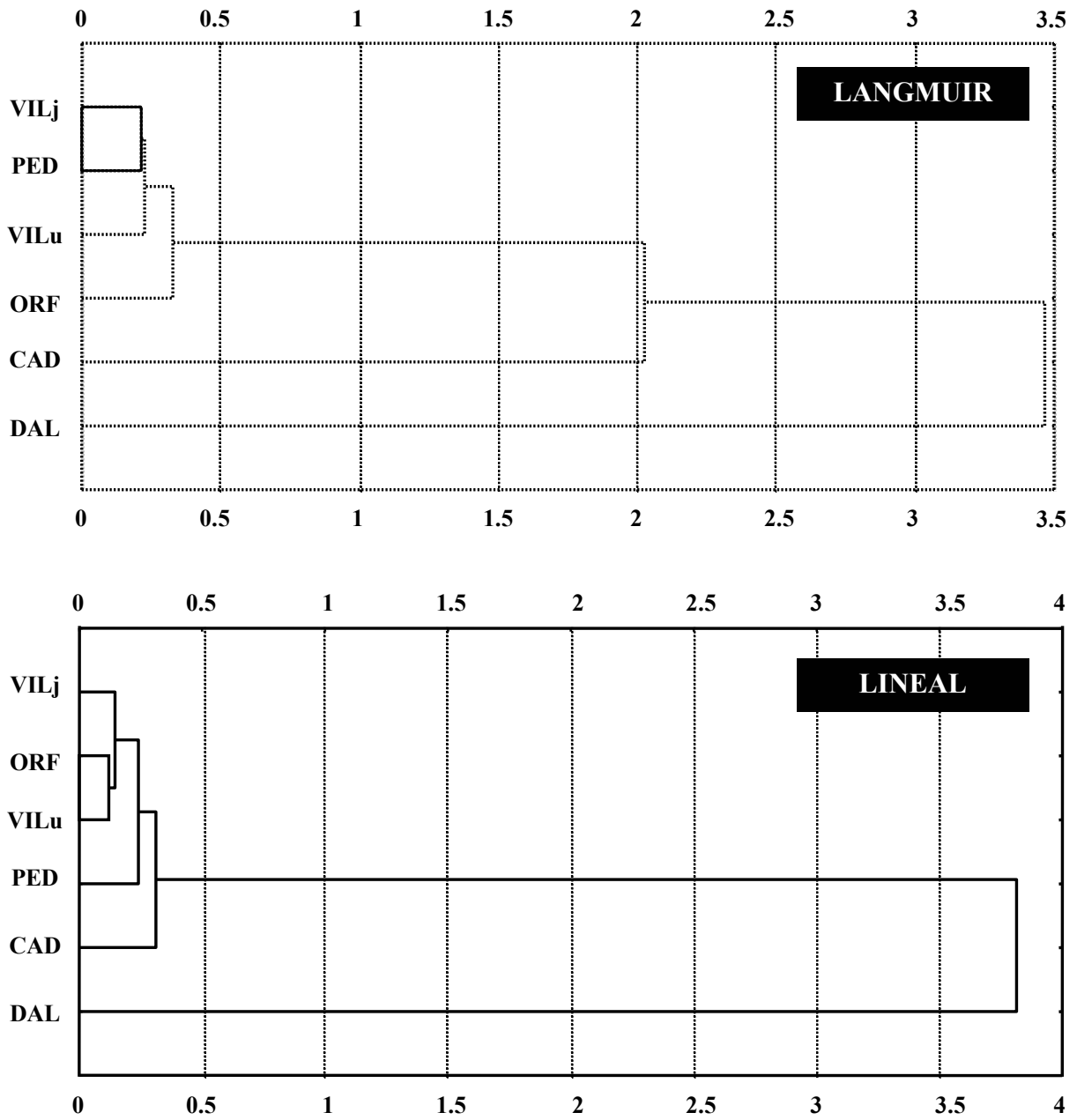


Figura 5.8 Dendograma de les distàncies de les mostres de sòl.

Arran d'aquests resultats es dedueix que el percentatge de matèria orgànica del sòl, tot i ser el paràmetre que es considera habitualment com a més important a l'hora d'establir l'afinitat dels compostos orgànics per un sòl determinat, no es l'únic paràmetre que s'ha de tenir en compte per als sòls avaluats en aquest estudi. Existeixen altres variables que afecten a la variabilitat de les dades de forma prou important perquè sigui necessari tenir-les en compte.

Si només es té en compte el contingut de matèria orgànica com a factor principal, caldria esperar que el sòl de St. Dalmai no formés cap agrupació amb la resta de sòls degut a l'elevat percentatge de matèria orgànica que presenta (**Taula 5.5**), com així succeeix. No obstant, aquesta propietat del sòl no és la única que ens condiciona el comportament dels sòls respecte a l'adsorció dels compostos fenòlics donat que el sòl de Vilaüt, que té un contingut en matèria orgànica força elevat (6.7 %) s'agrupa, segons l'anàlisi estadística, amb els sòls de Vilajuïga, Orfes i Pedret que són els que en tenen un menor percentatge (0.60, 0.83 i 0.98 %, respectivament).

Aquest comportament es pot explicar per diferents factors. Per exemple, és possible que part de la matèria orgànica sigui inaccessible per als compostos fenòlics perquè es trobi formant agregats amb partícules o amb la fracció argilosa del sòl. D'aquesta manera, el percentatge de matèria orgànica susceptible a participar en el procés d'adsorció de fenols per mitjà de mecanismes hidrofòbics és inferior al contingut total mesurat.

El pH del sòl també és un paràmetre important, sobretot en l'estudi de les propietats adsorptives de compostos ionitzables, com és el cas dels fenols. Els ions fenolat són repel·lits de la superfície de la fracció orgànica del sòl degut a que aquesta sempre conté una càrrega neta negativa [45]. En conseqüència, l'adsorció d'aquests compostos disminueix quan es troben en forma ionitzada. S'ha mesurat el pH de la solució de CaCl_2 0.01M després del procés d'equilibració i s'han obtingut valors diferents per a cada sòl. Per al cas del sòl de Vilaüt, el pH després d'equilibrar el sòl és de 7.68, el valor més bàsic de totes les mostres. Considerant els valors de pK_a de cada fenol, a aquest pH hi ha un percentatge important de 2CP, 2NP i 24DCP que es troba ionitzat, el que pot comportar la disminució de la seva adsorció.

El tipus de fracció argilosa associada a cada tipus de sòl també pot influir en la seva capacitat d'adsorció. Existeixen dos tipus principals de minerals argilosos en funció de la seva estructura, els de tipus 1:1 i els de tipus 2:1. L'estructura d'aquests minerals pot ser en capes tetraèdriques formades per l'associació de diferents tetràedres on cadascun conté quatre àtoms d'oxigen i un àtom de silici o en capes octaèdriques formades per octàedres amb sis oxígens coordinats amb un àtom d'alumini o un àtom de magnesi central [45]. Les argiles de tipus 1:1 alternen una capa tetraèdrica amb una capa octaèdrica mentre que la unitat bàsica de les argiles de tipus 2:1 està formada per una capa octaèdrica entre dues làmines tetraèdriques. Pel que fa a la seva càrrega, les argiles de tipus 1:1 poden adoptar càrrega negativa o positiva en funció del pH del sòl i quan presenten càrrega negativa aquesta sol ser globalment baixa. Les

argiles de tipus 2:1 solen presentar, en general, una gran quantitat de càrregues negatives i una elevada capacitat d'adsorció comparada amb les de tipus 1:1. Els sòls avaluats en aquest estudi contenen, bàsicament, dos tipus de minerals argilosos, kaolinita, de tipus 1:1 i illita, de tipus 2:1. No es coneix l'abundància de cada un d'ells en cada sòl, no obstant, aquesta pot fer variar la càrrega neta total de la fracció argilosa i, en conseqüència, l'adsorció de compostos fenòlics en ells.

Podem dir, doncs, que l'adsorció de compostos fenòlics en els sòls estudiats està condicionada pel contingut en matèria orgànica d'aquests. No obstant, altres paràmetres, com el pH del sòl, el seu contingut en argila, etc., són paràmetres que influeixen de forma significativa en el procés d'adsorció dels compostos ionitzables.

5.4 REFERÈNCIES

1. K.E. Noll, V. Gounaris, W.-S. Hou, *Adsorption technology for air and water pollution control*, Lewis Publishers, Chelsea (Estats Units) (1992) ISBN 0-87371-340-0.
2. F. Aiouèche, H. Lounici, D. Belhocine, H. Grib, D.L. Piron, N. Mameri, *Environ. Technol.* 21 (2000) 1215.
3. S. Rengaraj, S.-H. Moon, R. Sivabalan, B. Arabindoo, V. Murugesan, *J. Hazard. Mater.* B89 (2002) 185.
4. C. Namasivayam, D. Kavitha, *J. Hazard. Mater.* B98 (2003) 257.
5. M. Sarkar, P. Kumar Acharya, B. Bhattacharya, *J. Colloid Interface Sci.* 266 (2003) 28.
6. K. Nakagawa, A. Namba, S.R. Mukai, H. Tamon, P. Ariyadejwanich, W. Tanthapanichakoon, *Water Res.* 38 (2004) 1791.
7. A.W. Trochimczuk, M. Streat, B.N. Kolarz, *React. Funct. Polym.* 46 (2001) 259.
8. H. Li, M. Xu, Z. Shi, B. He, *J. Colloid Interface Sci.* 271 (2004) 47.
9. A. Li, Q. Zhang, J. Chen, Z. Fei, C. Long, W. Li, *React. Funct. Polym.* 49 (2001) 225.
10. A. Li, Q. Zhang, G. Zhang, J. Chen, Z. Fei, F. Liu, *Chemosphere* 47 (2002) 981.
11. B.C. Pan, Y. Xiong, Q. Su, A.M. Li, J.L. Chen, Q.X. Zhang, *Chemosphere* 51 (2003) 953.
12. N. Roostaei, F. Handan Tezel, *J. Environ. Manage.* 70 (2004) 157.
13. T. Saitoh, Y. Nakayama, M. Hiraide, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 205.
14. S. Zeng, Z. Yang, D. Hyun Jo, Y. Hee Park, *Water Res.* 38 (2004) 2315.
15. J. Peuravuori, N. Paaso, K. Pihlaja, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 79 (2001) 37.
16. J. Peuravuori, N. Paaso, K. Pihlaja, *Talanta* 56 (2002) 523.
17. I.M.C. Lo, R.K.M. Mak, *Wat. Sci. Tech.* 38 (1998) 143.
18. M. Ghiaci, A. Abbaspur, R. Kia, F. Seyedejn-Azad, *Sep. Purif. Technol.* 40 (2004) 217.
19. B.M. Gawlik, E.A. Feicht, W. Karcher, A. Kettrup, H. Muntau, *Chemosphere* 36 (1998) 2903.
20. P. Wu, G.-P. Yang, X.-K. Zhao, *J. Colloid Interface Sci.* 265 (2003) 251.
21. P. Lagas, *Chemosphere* 17 (1988) 205.
22. A. Bhandari, I. Cho, *Proceedings of the 1999 Conference on Hazardous Waste Research*, p. 27.
23. S. Fingler, S. Stipicevic, V. Drevenkar, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 83.

24. S.A. Boyd, *Soil Sci.* 134 (1982) 337.
25. C. Först, H. Simon, L. Stieglitz, *Vom Wasser* 82 (1994) 305.
26. J.-M. Bollag, S.-Y. Liu, R.D. Minard, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44 (1980) 52.
27. B.A. Bhandari, J.T. Novak, W.D. Burgos, D.F. Berry, *J. Environ. Eng., Maig* (1997) 506.
28. R.G. Luthy, G.R. Aiken, M.L. Brusseau, S.D. Cunningham, P.M. Gschwend, J.J. Pignatello, M. Reinhard, S.J. Traina, W.J. Weber Jr., J.C. Westall, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 3341.
29. R.N. Yong, A.M.O. Mohamed, B.P. Warkentin, *Principles of contaminant transport in soils*, Elsevier Science, Amsterdam (Holanda) (1992), ISBN 0-444-89819-0.
30. V.P. Evangelou, *Environmental soil and water chemistry. Principles and applications*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1998), ISBN 0-471-16515-8.
31. Y.-X. Chen, H.-L. Chen, Y.-T. Xu, M.-W. Shen, *Environ. Int.* 30 (2004) 31.
32. K.M. Spark, R.S. Swift, *Sci. Total Environ.* 298 (2002) 147.
33. P. Lafrance, L. Marineau, L. Perreault, J.-P. Villeneuve, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 2314.
34. C.T. Chiou, D.E. Kile, T.I. Brinton, R.L. Malcolm, J.A. Leenheer, P. McCarthy, *Environ. Sci. Technol.* 21 (1987) 1231.
35. R.L. Malcolm, P. McCarthy, *Environ. Sci. Technol.* 20 (1986) 904.
36. G. Haberhauer, L. Pfeiffer, M.H. Gerzabek, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3722.
37. T.G. Danis, T.A. Albanis, *Toxicol. Environ. Chem.* 62 (1997) 65.
38. S. Susarla, G.V. Bhaskar, S.M. Rao Bhamidimarri, *Environ. Technol.* 14 (1993) 159.
39. S. Susarla, G.V. Bhaskar, S.M.R. Bhamidimarri, *Environ. Technol.* 18 (1997) 937.
40. C.N. You, J.C. Liu, *Wat. Sci. Tech.* 33 (1996) 263.
41. E. Serra Bigas, *Adsorbents a partir de fangs biològics excedents de depuradora mitjançant l'aplicació de microones: estudi d'obtenció, caracterització i aplicació en fase líquida* (tesi doctoral). Universitat de Girona (2003).
42. J.M. Coulson, J.F. Richardson, *Chemical Engineering*, Pergamon Press, Oxford (Regne Unit) (1996) ISBN 0-7506-4445-1.
43. D.G. Kinniburgh, *Environ. Sci. Technol.* 20 (1986) 895.
44. OECD/OCDE 106, Guideline for the testing of chemicals. *Adsorption-desorption using a batch equilibrium method*. 21 Gener 2000.
45. N.C. Brady, R.R. Weil, *The nature and properties of soils*, Pearson Education (Estats Units) (2002), ISBN 0-13-016763-0.

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en els estudis que es recullen en aquesta memòria permeten extreure les conclusions següents:

Primera. S'ha desenvolupat un mètode de determinació en aigües dels onze compostos fenòlics presents en el mètode 604 de la EPA basat en la determinació per cromatografia líquida amb detecció per ultraviolat-visible. La separació dels anàlits és possible amb una fase mòbil d'acetonitril i aigua modificada amb un 1 % d'àcid acètic, en mode gradient, durant un temps total de 35 minuts i detecció a 275 i 316 nm. El mètode cromatogràfic desenvolupat és lineal en tot el rang de concentració estudiat (fins a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) i proporciona límits de detecció i quantificació per a tots els fenols de l'ordre dels $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, excepte per a pentaclorofenol, anàlit que pel seu elevat temps de retenció, dóna lloc a pics amples i amb poca sensibilitat i límits de detecció de 0.7 i $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en medi acetonitril i metanol, respectivament. El mètode presenta elevada repetibilitat amb valors de RSD inferiors al 5.3 %. En l'estudi de l'estabilitat de la resposta en 5 dies consecutius, els resultats obtinguts ens suggereixen la necessitat de realitzar un calibratge diari degut a la baixa reproductibilitat del mètode per a alguns anàlits (valors de RSD de fins al 21 %).

Segona. L'ús del cartutx comercial Spe-ed Advanta[®], basat en una matriu polimèrica amb presència de grups carbonílics, és adient per a l'extracció i preconcentració dels compostos fenòlics en aigües. Les condicions d'extracció més adients són un flux de càrrega de mostra igual o superior a $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, pH inferior o igual a 2 unitats i 2 mL d'acetonitril com a solvent d'elució.

Tercera. En les millors condicions experimentals assajades per l'etapa d'extracció en fase sòlida s'han analitzat volums de 0.1 a 1 L d'aigua MilliQ fortificada a nivells de 0.5 a $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i s'han obtingut recuperacions quantitatives per a tots els anàlits i en tots els casos. Igualment s'ha aplicat el mètode a la preconcentració d'aigua natural amb un elevat contingut en matèria orgànica fortificada a 2 i $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ amb els compostos fenòlics d'interès. S'han obtingut recuperacions superiors al 87 % en tots els casos excepte en treballar amb volums de mostra d'1 L, cas en el que la quantitat d'àcids húmics i fúlvics presents és prou important com per saturar el cartutx i evitar que s'hi adsorbeixin totalment els anàlits.

Quarta. S'han comparat els resultats obtinguts amb el cartutx Spe-ed Advanta[®] amb els aconseguits amb altres tipus de matrius com una fase de sílice funcionalitzada amb cadenes

C₁₈, amb la qual s'obtenen eficàcies molt menors per als anàlits més polars (Ph, 4NP i 2CP), i dues fases polimèriques comercials, Bakerbond SDB-1 i Oasis HLB, amb les que s'obtenen resultats similars als de la fase avaluada.

Cinquena. S'han desenvolupat dos mètodes per a la determinació de vuit compostos fenòlics bromosubstituïts, bisfenol A i tetraclorobisfenol A en aigües, basats en la cromatografia de gasos amb detecció per espectrometria de masses (GC-MS i GC-MS/MS). Ambdós mètodes són lineals en tot l'interval estudiat i presenten límits de detecció de l'ordre de pocs $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Sisena. S'han avaluat dos mètodes per a la derivatització dels compostos fenòlics exposats en el punt anterior, acetilació amb anhídrid acètic i sililació amb diferents agents, MSTFA, MTBSTFA i BSTFA. La sililació amb MSTFA ha resultat ser el mètode més adient ja que proporciona millors resolucions que els altres reactius en el cas de compostos de temps de retenció similars i els derivats que forma són més estables en presència de traces d'acetona, metanol i aigua en el medi de reacció. La derivatització té lloc de forma immediata en el port d'injecció del cromatògraf i, tot i que el volum d'agent derivatitzant no és un factor significatiu a l'hora d'aconseguir bones eficiències del procés, és necessari un excés de reactiu de 110 μL per aconseguir que els derivats formats siguin estables al llarg del temps.

Setena. El mètode desenvolupat de derivatització amb MSTFA i detecció per GC-MS dels compostos fenòlics s'ha aplicat a l'anàlisi d'aigua MilliQ i aigües residuals fortificades ($0.5\text{-}10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) prèvia preconcentració de les mostres per extracció en fase sòlida amb el cartutx comercial Oasis HLB. S'obtenen recuperacions quantitatives, factors de concentració elevats i límits de detecció del mètode global de l'ordre de pocs $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Vuitena. L'anàlisi dels onze compostos fenòlics considerats contaminants prioritaris en el mètode 604 de la EPA, presents en mostres de sòl amb un elevat percentatge de matèria orgànica, és possible per mitjà de l'extracció dels anàlits del sòl amb una solució de NaOH 0.1M i posterior *clean-up* dels extractes per SPE amb una matriu polimèrica de poliestirè-divinilbenzè, la qual és capaç d'eliminar part de la banda corresponent a la presència de substàncies húmiques i permet dur a terme, alhora, la preconcentració dels anàlits prèvia neutralització dels extractes. Els límits de detecció del mètode global es troben entre els 13 i 65 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ excepte per a pentaclorofenol ($> 1\ \text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

Novena. El mètode d'extracció i preconcentració de sòls s'ha validat analitzant un material de referència certificat (CRM112-100) que conté vuit dels onze compostos fenòlics estudiats a nivells de concentració entre 2 i 6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Els resultats obtinguts estan en consonància amb els intervals de confiança proporcionats per la casa comercial pel sòl de referència. S'ha dut a terme una segona validació mitjançant la comparació dels resultats obtinguts amb el nou mètode amb els aconseguits amb el mètode oficial 3540 de la EPA (*extracció soxhlet*) per a l'extracció d'un sòl fortificat a un nivell d'1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, i s'han obtingut recuperacions equivalents o fins i tot superiors a partir del nou mètode proposat.

Desena. S'han assajats dos mètodes de fortificació de sòls, *slurry spiking* i *spot spiking*. S'ha constatat la degradació de compostos fenòlics en el sòl durant l'evaporació del dissolvent en la fortificació per *slurry spiking*. Aquesta degradació, causada per adsorció irreversible dels fenols sobre alguns dels components del sòl, com la matèria orgànica o l'argila, degradació química per l'acció d'enzims i òxids metàl·lics o degradació biològica per la presència de microorganismes, té lloc en un període llarg de temps i, en l'anàlisi de mostres reals, és necessari conservar-les al congelador per tal de mantenir els nivells de contaminació presents al sòl en el moment de la presa de mostra.

Onzena. S'ha estudiat l'adsorció de quatre compostos fenòlics (Ph, 2CP, 2NP i 24DCP) en sis sòls de diferents característiques (contingut de matèria orgànica, pH, capacitat d'intercanvi, percentatge d'argila, sorra i llim, etc.). Les dades experimentals s'han ajustat, amb bons coeficients de correlació, a les equacions de les isoterms de Freundlich, Langmuir i lineal. Les constants d'adsorció (K) i els valors d'adsorció màxima (Q_{max}) són, en general, més grans pels compostos més hidrofòbics com el 24DCP; pel que fa als compostos fenòlics monosubstituïts, el 2-clorofenol és més hidrofòbic (apolar) que el 2-nitrofenol, no obstant, aquest últim proporciona valors de K i de Q_{max} superiors als de 2-clorofenol en alguns casos. Les isoterms per a tots aquests compostos són de tipus L, excepte per a fenol, compost que per la majoria de mostres estudiades presenta un perfil d'isoterma de tipus H. Aplicant una anàlisi per components principals a les dades obtingudes s'ha trobat que la capacitat d'adsorció d'un sòl no només depèn del percentatge de matèria orgànica sinó que el pH del sòl i el seu contingut en argila són paràmetres que cal tenir en compte així com també propietats dels anàlits com la seva hidrofobicitat i estructura química.

