Universitat de Girona

DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER AL SEGUIMENT D'HERBICIDES FENOXIACÈTICS I CAFEÏNA EN EL MEDI AMBIENT

Sònia MORET SOLÀ

ISBN: 978-84-690-4515-2
Dipòsit legal: GI-313-2007

Departament de Química
Àrea de Química Analítica

Tesi Doctoral

DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER AL SEGUIMENT D'HERBICIDES FENOXIACÈTICS I CAFEÏNA EN EL MEDI AMBIENT

Memòria presentada per **Sònia Moret Solà** per optar al grau de Doctora per la Universitat de Girona

Girona, 2006

Departament de Química
Àrea de Química Analítica

Manuela Hidalgo Muñoz, Professora Titular de Química Analítica de la Universitat de Girona i **Juan Manuel Sánchez Navarro**, Professor Titular de Química Analítica de la Universitat de Girona,

CERTIFIQUEM:

Que els estudis recollits en aquesta memòria sota el títol **"Desenvolupament de metodologia analítica per al seguiment d'herbicides fenoxiacètics i cafeïna en el medi ambient"**, han estat realitzats sota la nostra direcció per **Sònia Moret Solà**, llicenciada en Química, per optar el grau de Doctora per la Universitat de Girona.

I perquè així consti, signem la present certificació.

Girona, 26 de juliol del 2006

Dra. Manuela Hidalgo Muñoz Dr. Juan M. Sánchez Navarro

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

- "Evaluación de la situación actual y la posible afección a la calidad de las aguas subterráneas en base a los processos naturales producidos por la aplicación de las aguas residuales tratadas" (referència: HID99-0438-C02-01). 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).

Els estudis exposats en aquest treball han donat lloc a les següents publicacions:

- S. Moret, J.M. Sánchez, V. Salvadó, M. Hidalgo, "The evaluation of different sorbents for the preconcentration of phenoxyacetic acid herbicides and their metabolites from soils", J. Chromatogr. A, 1099 (2005), 55-63.

- S. Moret, M. Hidalgo, J.M. Sánchez, "Development of an Ion-Pairing Liquid Chromatography Method for the determination of phenoxyacetic herbicides and their main metabolites: application to the analysis of soil samples", Chromatographia, 63 (2006), 109-115.

- S. Moret, M. Sánchez, J.M. Sánchez, L. Candela, A. Cortés, S. Fabregat, M. Hidalgo, "A Hollow-Fiber Supported Liquid Membrane (HFSLM) coupled "on-line" to HPLC for the analysis of phenoxyacetic herbicides and their metabolites: application to the analysis of soil samples", en preparació.

- S. Moret, J.M. Sánchez, M. Hidalgo, "Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination from Municipal Wastewater Treatment Plants of different characteristics ", en preparació.

ÍNDEX GENERAL

Resum.....1
Resumen.....3
Summary.....5

CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL.....21

1.1. Compostos d'interès.....23

1.1.1. Herbicides fenoxiacètics.....23
1.1.1.1. Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D).....24
1.1.1.2. Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA).....27
1.1.1.3. Metabòlits fenòlics 29
1.1.2. Cafeïna.....32

1.2. Mètodes d'extracció i concentració.....34

1.2.1. Extracció líquid-líquid (LLE).....35
1.2.2. Extracció en fase sòlida (SPE).....36
1.2.3. Microextracció en fase sòlida (SPME).....41
1.2.4. Membranes líquides.....42
1.1.5. Extracció sòlid-líquid (SLE).....45

1.3. Transport i destí dels plaguicides en el medi ambient.....46

1.4. Referències.....48

CAPÍTOL 2: DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE 2,4-D, MCPA I ELS SEUS METABÒLITS FENÒLICS……..…..……..55

2.1. Determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics.....58

2.1.1. Tècniques cromatogràfiques.....58
2.1.1.1. Cromatografia de gasos 58
2.1.1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).....60
2.1.2. Electroforesi capil·lar.....62

2.2. Experimental.....63

2.2.1. Reactius.....63
2.2.2. Dissolucions.....63
2.2.3. Aparells i materials.....64

2.3. Resultats i discussió.....65

2.3.1. Desenvolupament d'un mètode IP-HPLC.....65
2.3.1.1. Longitud d'ona de detecció.....65
2.3.1.2. Composició de la fase mòbil.....66
2.3.1.3. Dissolvent de la mostra.....74

2.4. Referències.....77

<u>CAPÍTOL 3</u>: AVALUACIÓ DE DIFERENTS SORBENTS PER A L'ENRIQUIMENT DE 2,4-D, MCPA I ELS SEUS METABÒLITS FENÒLICS EN MOSTRES DE SÒL……...…..…..……..…79

3.1. Extracció en fase sòlida.....81

3.1.1. Adsorbents en SPE.....87
3.1.1.1. Adsorbents de sílica de fase lligada.....88
3.1.1.2. Sòlids adsorbents de carbó.....89
3.1.1.3. Resines de matriu polimèrica.....89
3.1.2. Formats SPE disponibles comercialment.....91
3.1.3. Acoblament "*on-line*" de SPE a les tècniques cromatogràfiques.....91
3.1.4. Problemàtica en la determinació de compostos polars.....93

3.2. Experimental.....96

3.2.1. Reactius.....96
3.2.2. Dissolucions.....96
3.2.3. Aparells i materials.....97
3.2.4. Procediment experimental.....98
3.2.4.1. Presa de mostra de sòls.....98
3.2.4.2. Extracció de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics.....98

3.3. Resultats i discussió.....100

3.3.1. Desenvolupament de l'extracció alcalina.....100
3.3.2. Selecció de l'adsorbent per a SPE.....103
3.3.3. Influència de la velocitat de flux de la mostra.....108
3.3.4. Estudi de les variables d'elució.....109
3.3.4.1. Dissolvents de desorció.....109
3.3.4.2. Determinació del volum d'elució.....111
3.3.5. Validació del mètode analític desenvolupat.....114
3.3.6. Anàlisi de mostres reals.....115

3.4. Referències.....117

<u>CAPÍTOL 4</u>: DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA DE MEMBRANA LÍQUIDA ACOBLAT "*ON-LINE*" A HPLC PER A LA CONCENTRACIÓ I "*CLEAN-UP*" DE 2,4-D, MCPA I METABÒLITS FENÒLICS EN EXTRACTES DE SÒLS…….…….…….119

4.1. Introducció.....122

4.1.1. Membranes líquides suportades (SLM).....122
4.1.1.1. Avantatges i limitacions de les SLM.....123
4.1.1.2. Aplicacions de les membranes líquides suportades.....124

4.2. Experimental.....128

4.2.1. Reactius.....128

4.2.2. Dissolucions.....129
4.2.3. Aparells i materials.....129
4.2.4. Procediment experimental.....130
4.2.4.1. Determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics.....130
4.2.4.2. Experiments amb membrana líquida suportada.....130

4.3. Resultats i discussió.....135

4.3.1. Disseny del sistema de membrana líquida.....135
4.3.1.1. Dissolvent orgànic.....136
4.3.1.2. Temps d'operació.....137
4.3.2. Experiments de preconcentració.....138
4.3.2.1. Anàlisi de mostres de sòls.....140
4.3.3. Comparació de resultats de SPE i SLM.....144

4.4. Referències.....146

CAPÍTOL 5: ESTUDI DE L'ADSORCIÓ I TRANSPORT DE 2,4-D, MCPA I ELS SEUS METABÒLITS FENÒLICS EN SÒLS……..……..……..……149

5.1. Introducció.....151

5.1.1. Comportament dels plaguicides en el sòl.....153
5.1.1.1. Composició del sòl.....153
5.1.1.2. Adsorció de contaminants orgànics en sòls.....153
5.1.1.3. Isotermes d'adsorció.....155
5.1.1.4. Estudis d'adsorció en columnes de sòl.....159

5.2. Experimental.....161

5.2.1. Reactius.....161
5.2.2. Dissolucions.....161
5.2.3. Aparells i materials.....162
5.2.4. Àrea d'estudi.....163
5.2.4.1. Localització i situació geogràfica.....163
5.2.4.2. Qualitat de l'aigua de reg.....164
5.2.5. Determinació de matèria orgànica en els sòls.....166
5.2.6. Experiments d'adsorció en discontinu ("*batch*").....167
5.2.7. Experiments d'adsorció en columna.....168
5.2.8. Estudi de camp.....171

5.3. Resultats i discussió.....175

5.3.1. Caracterització de l'adsorció. Assaigs de laboratori.....175
5.3.1.1. Estudis en condicions d'equilibri. Experiments en discontinu ("*batch*").....175
5.3.1.2. Assaigs en columna.....183
5.3.2. Estudi de camp.....190
5.3.2.1. Parcel·la instrumentada.....190
5.3.2.2. Aplicació de l'herbicida.....193
5.3.2.2. Anàlisi de sòls.....193

5.4. Referències.....200

<u>CAPÍTOL 6</u>: LA CAFEÏNA COM A MARCADOR DE CONTAMINACIÓ PER A AIGÜES SUPERFICIALS I EN EL PROCÉS DE DEPURACIÓ D'AIGÜES RESIDUALS……..……..……..…203

6.1. Introducció.....206

6.1.1. Determinació de la cafeïna.....207
6.1.1.1 Cromatografia de gasos.....207
6.1.1.2 Cromatografia líquida.....207
6.1.1.3 Altres tècniques de determinació de cafeïna.....209
6.1.2. La cafeïna com a marcador de contaminació en aigües superficials de la Costa Brava.....209
6.1.3. La cafeïna en el procés de depuració d'aigües residuals 213

6.2. Experimental.....220

6.2.1. Reactius.....220
6.2.2. Dissolucions.....220
6.2.3. Aparells i materials.....220
6.2.4. Presa de mostra.....221
6.2.4.1. Aigües naturals.....221
6.2.4.2. Aigües residuals.....224
6.2.5. Tractament de mostra.....225
6.2.5.1. Extracció en fase sòlida, procés "*off-line*".....226
6.2.5.2. Extracció en fase sòlida, procés "*on-line*".....226
6.2.6. Mètode cromatogràfic d'anàlisi.....228

6.3. Resultats i discussió.....230

6.3.1. Caracterització del mètode cromatogràfic.....230
6.3.1.1. Límit de detecció i de quantificació.....230
6.3.1.2. Interval lineal... 231
6.3.1.3. Altres paràmetres de qualitat.....232
6.3.2. Desenvolupament d'un mètode SPE "*off-line*" per a la cafeïna.....232
6.3.2.1. Volum de trencament.....233
6.3.2.2. Dissolvent d'elució.....234
6.3.2.3. Velocitat de càrrega.....235
6.3.2.4. Velocitat d'elució.....236
6.3.3. Desenvolupament d'un mètode SPE-HPLC "*on-line*" per a la cafeïna.....236
6.3.3.1. Capacitat d'extracció de la mini-columna (procés "*at-line*").....237
6.3.3.2. El procés SPE-HPLC "*on-line*": calibratge de la cafeïna.....239
6.3.4. Monitorització de cafeïna en aigües superficials de la Costa Brava.....243
6.3.5. Seguiment de cafeïna en el procés de depuració d'aigües residuals urbanes.246

6.4. Referències.....249

Conclusions.....251

RESUM

RESUM

El control d'herbicides i altres anàlits orgànics presents en el medi ambient constitueix una pràctica habitual en els laboratoris des de l'establiment de legislacions que limiten la seva concentració. Per aquesta raó, cal el desenvolupament de noves metodologies analítiques per al seguiment de compostos orgànics en el medi. Molt sovint aquests anàlits es troben a nivells traça en aigües i sòls, conjuntament amb un alt contingut de substàncies húmiques i fúlviques. Així, un dels reptes existents és el tractament de la mostra (extracció, concentració i "*clean-up*" d'aquests anàlits per a una bona quantificació). Aquests processos han de venir complementats per tècniques cromatogràfiques que permetin la mesura final dels anàlits.

La investigació que es presenta en aquesta tesi es centra en el desenvolupament d'un mètode per a la determinació de 2,4-D i MCPA i els seus metabòlits fenòlics i d'un altre per a la determinació de cafeïna. El primer dels procediments desenvolupats s'ha aplicat al seguiment dels herbicides i els metabòlits fenòlics en sòls d'un camp de golf, mentre que el segon s'ha emprat per a la determinació de cafeïna en aigües naturals i, posteriorment, en aigües residuals.

La cromatografia líquida per parell iònic és una tècnica utilitzada en la determinació d'herbicides acídics i compostos clorofenòlics ja que no requereix una derivatització prèvia dels anàlits. La presència d'anells aromàtics a la seva estructura fa que aquests compostos es puguin determinar per detecció UV-Visible. En el **Capítol 2** es desenvolupa un mètode de cromatografia líquida per parell iònic per a la determinació conjunta, en aigües i, posteriorment, en sòls, d'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D), àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA) i els seus principals metabòlits clorofenòlics, 2-metilfenol (2-MP), 2-clorofenol (2-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP) i 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). El mètode desenvolupat per a l'anàlisi conjunta dels set anàlits es basa en la utilització d'una fase mòbil acetonitril:aigua (30:70) amb 10 mM d'hidròxid de tetrabutilamoni (TBA-OH) a pH = 7.2, fixant la longitud d'ona de treball a 230 nm. La separació dels anàlits s'aconsegueix en un temps inferior a 22 minuts i els resultats obtinguts mostren que el mètode presenta una bona linealitat. Pel que fa al límit de detecció del mètode es

troba en l'interval dels $\mu g.L^{-1}$ per a tots els compostos. Per a la determinació de cafeïna (**Capítol 6**) s'utilitza la cromatografia líquida en fase invertida amb una fase mòbil acetonitril:aigua (20:80), fixant com a longitud d'ona de treball 272 nm. S'ha comprovat que el mètode cromatogràfic és lineal en l'interval 4-1000 $\mu g.L^{-1}$, interval dins el qual s'esperen obtenir les concentracions de les diferents mostres provinents d'aigües naturals i de les estacions depuradores d'aigua residual (EDAR). El límit de detecció experimental de la cafeïna per al mètode HPLC emprat és de 1 $\mu g.L^{-1}$, mentre que el límit de quantificació és de 4 $\mu g.L^{-1}$. El mètode presenta bona repetibilitat i reproductibilitat.

En la majoria dels mètodes de determinació de contaminants orgànics és necessària la introducció d'etapes de preconcentració i "*clean-up*" prèvies a la detecció, ja que aquests es troben a nivells traça i les tècniques cromatogràfiques no són prou sensibles per detectar aquests nivells. L'extracció en fase sòlida és la tècnica més aplicada, per la seva simplicitat i senzillesa i pel gran número de fases sòlides disponibles. En el **Capítol 3** s'avaluen diferents sorbents per a l'enriquiment i "*clean-up*" dels herbicides i metabòlits d'interès conjuntament amb un desenvolupament de l'etapa d'extracció dels anàlits del sòl. L'anàlisi de les mostres de sòl requereix una extracció dels anàlits per mitjà de mètodes agressius i poc selectius, fet que provoca que es coextreguin un nombre elevat d'interferències juntament amb els compostos d'interès. Es fixa una concentració d'hidròxid sòdic de 0.01 M per a l'extracció alcalina ja que dóna recuperacions adequades per a tots els anàlits i el nivell de coextracció de substàncies húmiques i fúlviques és suficientment baix per permetre un adequat "*clean-up*". Dins aquest estudi s'han avaluat l'eficàcia de fases sòlides de diferents característiques, una matriu de sílice amb cadenes C_{18} (ACCUBOND® II ODS), una resina de poliestirè-divinilbenzè (Amberlite XAD-2) i una fase de poliestirè-divinilbenzè (Bakerbond SDB-1). Cal buscar l'adsorbent òptim en condicions alcalines de la mostra. L'adsorbent de sílica convencional queda rebutjat en només proporcionar recuperacions òptimes a valors de pH inferiors o iguals a 3. Els dos adsorbents de PS-DVB proporcionen un mecanisme via interaccions π-π amb els anells aromàtics dels anàlits que fa que no sigui necessària tenir la forma protonada de l'anàlit per a la seva adsorció quantitativa. L'adsorbent SDB-1 és la millor opció per a la concentració quantitativa dels set anàlits quan són extrets de les mostres de sòl amb hidròxid sòdic 0.01 M. Amb aquest adsorbent no cal ajustar el pH de la mostra abans de l'etapa de

concentració i "*clean-up*". Es requereixen fluxos de mostra de 0.5 mL·min^{-1} degut a l'elevada polaritat de 2,4-D i MCPA, fent necessari augmentar el temps de contacte entre anàlit i adsorbent. Les elucions seran realitzades en dues fraccions, la primera amb 5 mL de metanol:aigua (1:1) on es recuperen quantitativament 2,4-D (106±7 %) i MCPA (103±3 %). El 2-CP i 4-CP els quals són solubles en aigua, també són eluïts en aquestes condicions però les recuperacions són inferiors al 100 %. El 2-CP s'elueix en un percentatge superior al 90 % i el 4-CP només és eluït parcialment (entre 3-40 % depenent de la quantitat d'anàlit retingut). Els altres metabòlits (2-MP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) no són eluïts de l'adsorbent amb aquesta barreja i requereixen una segona elució amb 4 mL de metanol 100 %. S'ha treballat amb volums de 20 mL i a un nivell de fortificació de 1 mg·L^{-1}. Respecte a la cafeïna (**Capítol 6**), en ser un compost neutre s'ha realitzat la concentració i "*clean-up*" en un adsorbent de sílica amb cadenes C_{18} (ACCUBOND®), donant recuperacions quantitatives en treballar amb volums de 100 mL de mostra, a nivells de 0.1 mg·L^{-1}, fluxos de càrrega de 25 mL·min^{-1} i elucions amb 2 mL de metanol. El límit de detecció de la cafeïna en aquest procés "*off-line*" amb l'HPLC és de 1 µg·L^{-1}. Per millorar aquest valor es desenvolupa un mètode SPE-HPLC "*on-line*" per a la determinació de la cafeïna que augmenta l'eficàcia, sensibilitat i rapidesa. Amb el sistema "*on-line*" s'obtenen recuperacions quantitatives (minicolumna de 100 mg, volum d'elució de 300 µL i concentracions entre 25 i 100 ng·L^{-1}) i un límit de detecció 67 vegades millor que amb el procés "*off-line*". Per tal d'avaluar el procés SPE-HPLC "*on-line*" s'analitzen mostres d'aigües naturals i posteriorment s'aplica la metodologia desenvolupada a aigües residuals procedents de EDARs amb una alt contingut de matèria orgànica.

Paral·lelament a l'extracció en fase sòlida, en el **Capítol 4** es busca una alternativa que té com a objectiu millorar les condicions de concentració i "*clean-up*" aconseguides en el cas del 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics. Les membranes líquides suportades (SLM) s'utilitzen per a extraccions selectives i preconcentracions eficients, a més aquesta metodologia permet aconseguir factors de recuperació elevats i es pot acoblar fàcilment "*on-line*" a sistemes com la cromatografia líquida. S'opta pel desenvolupament d'un sistema de membrana líquida suportada acoblada al sistema HPLC per tal de determinar els herbicides fenoxiacètics i metabòlits fenòlics en mostres de sòl. En els estudis de SLM s'ha utilitzat dos tipus de geometria: membranes laminars i fibra buida ("*hollow fiber*"). Amb el primer tipus de geometria s'avalua l'efecte de les diferents variables que afecten el funcionament del sistema de membrana. S'escull l'éter

dihexílic com a dissolvent ja que és que el dóna millors recuperacions per a una concentració de 1 mg·L^{-1} per a cada anàlit, amb una fase de càrrega de 200 mL de àcid sulfúric 0.1 M i una fase de retroextracció o receptora de 200 mL d'hidròxid sòdic 0.01 M. El temps d'extracció ha estat de 2 hores amb una agitació a 1000 rpm. La geometria tubular permet la concentració dels anàlits de la mostra. Els factors de concentració obtinguts recirculant 50 mL de fase de càrrega pel per la part externa del la fibra i 5 mL de fase receptora pel lumen durant 1 hora són 2.2, 2.9, 4.4, 6.0 i 5.6 per a MCPA, 2,4-D, 4-CP, 2,4-DCP i 4-C-2-MP, respectivament. La geometria de fibra buida s'ha aplicat a l'anàlisi d'extractes de sòl en un sistema "*on-line*" HFSLM-HPLC. L'estudi de diferents volums de fase de càrrega i fase receptora han mostrat que un volum de 20 mL de fase de càrrega (extracte de sòl fortificat a pH = 1) i 1 mL de fase receptora (dissolució d'hidròxid sòdic 0.01M) són adients. En aquest sistema s'han aconseguit repetibilitats inferiors al 5 % i reproductibilitats inferiors al 8 %, expressades com desviació estàndard relativa. El mètode és lineal en un interval de 1-25 µg·L^{-1} (anàlisi d'extractes fortificats). Els límits de detecció i quantificació trobats experimentalment per a tots els compostos en l'anàlisi de mostres de sòl fortificades es troben entre 0.1 i 0.3 µg·L^{-1}.

La tècnica de preconcentració de membrana líquida en geometria buida es compara amb la tècnica d'extracció en fase sòlida (SPE). En la comparació de les dues tècniques s'observa que ambdues proporcionen un alt nivell en el "*clean-up*" en els extractes de sòls, un alt factor de concentració i una eficient separació dels anàlits en relació a la matèria orgànica present a les mostres de sòl. No obstant això, el sistema de membrana líquida aporta millors resultats ja que la fase receptora és un medi aquós més compatible amb el mètode de detecció per IP-HPLC i tots els anàlits poden ser extrets i analitzats en una única fracció. La tècnica d'extracció en fase sòlida requereix l'elució dels anàlits en dues fraccions separades i necessita volums elevats de dissolvents orgànics. SPE utilitza varis mil·lilitres de metanol per condicionar l'adsorbent i per eluir els anàlits, mentre que la geometria de fibra buida només utilitza uns quants microlitres d'éter dihexílic. A més, la geometria de fibra buida proporciona límits de detecció (0.1 µg·kg sòl^{-1}) inferiors a l'extracció en fase sòlida (3-10 µg·kg sòl^{-1}).

Finalment, en el **Capítol 5,** la metodologia analítica desenvolupada ha estat aplicada a l'estudi de l'adsorció i transport de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics en

sòls. En el laboratori, l'estudi de l'adsorció s'ha realitzat mitjançant experiments en "*batch*" que han permès determinar les corresponents isotermes d'adsorció, i assaigs en columnes. Aquestes primeres ens aporten les constants d'adsorció de cada anàlit segons models teòrics. Els resultats ajustats pel model de Freundlich per regressió no lineal donen constants de Freundlich de 0.62, 0.44 i 0.4 per al 2,4-D a tres profunditats de sòl i de 0.77, 0.65 i 0.44 per al MCPA en les mateixes condicions. Els assaigs en columnes ens proporcionen informació addicional en paràmetres d'adsorció i també de desorció. Es conclou que el 2,4-D té una adsorció no instantània, necessita un temps elevat per a una equilibració òptima, i que, al mateix flux, la desorció és un procés més ràpid que l'adsorció. També dir que el 2,4-D presenta un temps de residència menor dins la columna quan es troba conjuntament amb MCPA. S'ha realitzat un experiment de camp amb l'objectiu d'estudiar la dinàmica dels herbicides en condicions reals. Amb aquesta finalitat va realitzar una aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal®, que conté com a ingredients actius 2,4-D i MCPA, i juntament amb un traçador, en una parcel·la de 100 m^2 situada en el camp de golf Serres de Pals, irrigada amb aigua regenerada. Les mostres de sòl són obtingudes del camp a diferents profunditats i diferents intervals de temps després de l'aplicació del producte comercial per estudiar la mobilitat i la degradació dels herbicides fenoxiacètics. Per a l'anàlisi de les mostres s'opta per l'extracció en membrana líquida suportada degut als avantatges que presenta davant l'extracció en fase sòlida per les necessitats concretes d'aquest estudi. S'observa que al sòl més superficial (0-10 cm) els nivells més elevats s'obtenen el primer dia després de l'aplicació (34.1 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per al 2,4-D i 17.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per al MCPA). A partir del novè dia després de l'aplicació ja no s'observen més davallades destacables en els nivells dels dos anàlits i les concentracions detectades es mantenen entre 0.78 i 1.7 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per a 2,4-D i 0.53 i 2.0 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per a MCPA. A la profunditat intermèdia s'observa com en els primers dies després de l'aplicació encara no s'assoleix el màxim de concentració dels dos ingredients actius de l'herbicida (14.5 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per a 2,4-D i 6.1 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per a MCPA). Els nivells màxims es detecten el tercer dia després de l'aplicació, coincidint amb el descens que s'observa en sòls superficials (36.0 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per a 2,4-D i 11.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per a MCPA). Aquest fet és degut al transport ràpid del 2,4-D i MCPA des de la fracció més superficial a la intermèdia. A partir del sisè dia ja no es detecten els dos anàlits en la majoria dels casos. En les mostres de sòl corresponents a profunditat major (30-60 cm) no s'han detectat cap dels dos herbicides en les mostres analitzades. La dilució dels anàlits a mesura que es van difonent a través

del sòl, conjuntament amb la seva degradació, explica perquè no és possible detectar-los en aquesta fracció. Pel que respecte a la degradació del 2,4-D i MCPA als seus metabòlits fenòlics, trobem que el 2-MP es troba a concentració màxima (13.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}) al sòl de profunditat intermèdia 14 dies després de l'aplicació de l'herbicida passant per concentracions inferiors, fins a 0.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}, a profunditat de 30-60 cm el dia 70 després d'aplicació. Els altres metabòlits fenòlics tenen comportament similar.

RESUMEN

El control de herbicidas y otros analitos orgánicos presentes en el medio ambiente constituye una práctica habitual en los laboratorios desde la implantación de legislaciones que ponen límites a las concentraciones de estas sustancies. Por esta razón, es necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para el control de compuestos orgánicos en el medio. Frecuentemente, estos analitos se encuentran a niveles traza tanto en aguas como en suelos, conjuntamente con un alto contenido de sustancias húmicas y fúlvicas. Uno de los retos en este tipo de análisis es el tratamiento de la muestra (extracción, concentración y "*clean-up*" de los analitos para una cuantificación correcta). Estos procesos tienen que estar complementados con el uso de técnicas cromatográficas que permitan la medida final de los analitos.

La investigación que se presenta en esta tesis se centra en el desarrollo de un método para la determinación de 2,4-D, MCPA y sus metabolitos fenólicos y de otro para la determinación de cafeína. El primero de los procedimientos desarrollados se ha aplicado al seguimiento de los herbicidas y sus metabolitos fenólicos en suelos de un campo de golf, mientras que el segundo se ha utilizado para la determinación de cafeína en aguas naturales y, posteriormente, en aguas residuales.

La cromatografía líquida de par iónico es la técnica utilizada en la determinación de herbicidas acídicos y compuestos clorofenólicos ya que no se requiere una derivatización de los analitos previa al análisis cromatográfico. La presencia de anillos aromáticos en la estructura de estos compuestos hace que se puedan analizar por detección UV-Visible. En el **Capítulo 2** se desarrolla un método de cromatografía líquida de par iónico para la determinación conjunta, en aguas y, posteriormente, en suelos, de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-cloro-2-metilofenoxiacético (MCPA) y sus principales metabolitos clorofenólicos, 2-metilofenol (2-MP), 2.clorofenol (2-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-2-metilofenol (4-C-2-MP) y 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). El método desarrollado para el análisis conjunto de los siete analitos se basa en la utilización de una fase móvil de acetronitrilo:agua (30:70) con 10 mM de hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH) a pH = 7.2, fijando la longitud de onda de trabajo a 230 nm. La separación de los analitos se consigue en un tiempo

inferior a 22 minutos y los resultados obtenidos muestran que el método presenta una linealidad adecuada. El límite de detección del método se encuentra en el intervalo de los $\mu g.L^{-1}$ para todos los compuestos analizados. Para la determinación de la cafeína (**Capítulo 6**) se utiliza la cromatografía líquida de fase inversa con una fase móvil de acetonitrilo:agua (20:80), fijando como a longitud de onda de trabajo 272 nm. Se ha comprobado que el método cromatográfico es lineal en el intervalo 4-1000 $\mu g.L^{-1}$, intervalo dentro el cual se esperan obtener las concentraciones de las diferentes muestras procedentes de aguas naturales y de las estaciones depuradoras de agua residual (EDAR). El límite de detección experimental de la cafeína para el método HPLC utilizado es de 1 $\mu g.L^{-1}$, mientras que el límite de cuantificación es de 4 $\mu g.L^{-1}$. El método presenta buena repetibilidad y reproducibilidad.

En la mayoría de los métodos de determinación de contaminantes orgánicos es necesaria la introducción de etapas de preconcentración y "*clean-up*" previas a la detección, ya que estos se encuentran a niveles traza y las técnicas cromatográficas no son lo suficientemente sensibles para detectar estos niveles. La extracción en fase sólida es la técnica más aplicada por su simplicidad y sencillez, y por el gran número de fases sólidas disponibles. En el **Capítulo 3** se evalúan diferentes fases sólidas para el enriquecimiento y "*clean-up*" de los analitos, conjuntamente con un desarrollo de la etapa de extracción de los analitos del suelo. El análisis de muestras de suelos requiere una extracción de los analitos a través de métodos agresivos y poco selectivos, lo que provoca la extracción de un número elevado de interferencias conjuntamente con los compuestos de interés. Se fija una concentración 0.01 M de hidróxido sódico para la extracción alcalina ya que proporciona recuperaciones adecuadas para todos los analitos, mientras que el nivel de coextracción de sustancias húmicas y fúlvicas es lo suficientemente bajo para permitir un adecuado "*clean-up*". Dentro de este estudio se ha evaluado la eficiencia de fases sólidas de diferentes características, una matriz de sílice con cadenas C_{18} (ACCUBOND® II ODS), una resina de poliestireno-divinilobenceno (Amberlite XAD-2) y una fase de poliestireno-divinilobenceno (Bakerbond SDB-1). Se ha de buscar el adsorbente más adecuado teniendo en cuenta las condiciones alcalinas del extracto de la muestra. El adsorbente de sílice convencional se descarta ya que únicamente proporciona recuperaciones óptimas a valores de pH inferiores o iguales a 3. Los dos adsorbentes de poliestireno actúan mediante un mecanismo de interacciones π-π con los anillos aromáticos de los analitos que no requiere tener la forma protonada

del analito para su adsorción cuantitativa. El adsorbente SDB-1 es la mejor opción para la concentración cuantitativa de los siete analitos cuando son extraídos de las muestras de suelo con hidróxido sódico 0.01 M. Con esta fase sólida no es necesario ajustar el pH del extracto alcalino previamente a la etapa de concentración y "*clean-up*". Se requieren flujos de paso de muestra por la fase sólida de 0.5 $mL \cdot min^{-1}$ debido a la elevada polaridad de 2,4-D y MCPA, lo que permite aumentar el tiempo de contacto entre el analito y el adsorbente. Las eluciones se realizan en dos fracciones: la primera con 5 mL de metanol:agua (1:1), en la que se recuperan cuantitativamente 2,4-D (106±7) y MCPA (103±3 %). Los analitos 2-CP y 4-CP son también solubles en agua y se eluyen en estas condiciones pero las recuperaciones son inferiores al 100%. El 2-CP se eluye en un porcentaje superior al 90% y el 4-CP sólo se eluye parcialmente (entre 3-40% dependiendo de la cantidad de analito retenido). Los otros metabolitos (2-MP, 4-C-2-CP y 2,4-DCP) no son eluídos del adsorbente con esta mezcla i requieren una segunda elución con 4 mL de metanol 100%. Se ha trabajado con volúmenes de 20 mL y a un nivel de fortificación de 1 $mg \cdot L^{-1}$.

Para la cafeína (**Capítulo 6**), al ser un compuesto neutro, se ha realizado la concentración y "*clean-up*" con un adsorbente de sílice con cadenas C_{18} (ACCUBOND®), obteniéndose recuperaciones cuantitativas trabajando con volúmenes de muestra de 100 mL, a niveles de 0.1 $mg \cdot L^{-1}$, flujos de carga de 25 $mL \cdot min^{-1}$ y eluciones con 2 mL de metanol. El límite de detección de la cafeína mediante el proceso SPE "*off-line*" es de 1 $\mu g \cdot L^{-1}$. Para mejorar este valor se desarrolla un método SPE-HPLC "*on-line*" que aumenta la eficacia, sensibilidad y rapidez en la determinación de cafeína. Con el sistema "*on-line*" se obtienen recuperaciones cuantitativas (minicolumna de 100 mg, volumen de elución de 300 µL y concentraciones entre 25 y 100 $ng \cdot L^{-1}$) y un límite de detección 67 veces mejor que con el proceso "*off-line*". Para evaluar el proceso SPE-HPLC "*on-line*" se analizan muestras de aguas naturales i posteriormente se ha aplicado la metodología desarrollada a aguas residuales procedentes de EDARs con un alto contenido de materia orgánica.

Paralelamente a la extracción en fase sólida, en el **Capítulo 4** se estudia una alternativa que tiene como objetivo mejorar las condiciones de concentración y "*clean-up*" para 2,4-D, MCPA y sus metabolitos fenólicos. Las membranas líquidas soportadas (SLM) se utilizan para extracciones selectivas y preconcentraciones eficientes. Esta metodología permite obtener factores de recuperación elevados y se puede acoplar

fácilmente "*on-line*" a sistemas como la cromatografía líquida. Se ha optado por el desarrollo de un sistema de membrana líquida soportada acoplada al sistema IP-HPLC para determinar los herbicidas fenoxiacéticos y sus metabolitos fenólicos en muestras de suelos. Para los estudios mediante SLM se han utilizado dos tipos de geometrías: membranas laminares y fibra hueca ("*hollow fiber*"). Con el primer tipo de geometría se evalúa el efecto de las diferentes variables que afectan al funcionamiento del sistema de membrana. Se selecciona éter dihexílico como disolvente ya que es el que da mejores recuperaciones para una concentración de 1 $mg \cdot L^{-1}$ para cada analito, con una fase de carga de 200 mL de ácido sulfúrico 0.1 M y una fase de retroextracción o receptora de 200 mL de hidróxido sódico 0.01 M. La geometría tubular se consigue la concentración de los analitos de la muestra. Los factores de concentración obtenidos recirculando 50 mL de fase de carga por el exterior de la fibra y 5 mL de fase receptora por el lumen durante 1 hora han sido 2.2, 2.9, 4.4, 6.0 y 5.6 para MCPA, 2,4-D, 4-CP, 2,4-DCP y 4-C-2-MP, respectivamente. La geometría de fibra hueca se ha aplicado al análisis de extractos de suelos mediante un sistema "*on-line*" HFSLM-HPLC. El estudio de diferentes volúmenes de fase de carga y fase receptora han mostrado que un volumen de 20 mL de fase de carga (extracto de suelo fortificado a pH = 1) y 1 mL de fase receptora (disolución de hidróxido sódico 0.01 M) son los idóneos. Con este sistema se han conseguido repetibilidades inferiores al 5 % y reproducibilidades inferiores al 8 %, expresadas como desviación estándar relativa. El método es lineal en un intervalo de 1-25 $\mu g \cdot L^{-1}$ (análisis de extractos fortificados). Los límites de detección y cuantificación encontrados experimentalmente para todos los compuestos para el análisis de muestras de suelos fortificados se hallan entre 0.1 y 0.3 $\mu g \cdot L^{-1}$.

La técnica de preconcentración de membrana líquida en geometría tubular se ha comparado con la técnica de extracción en fase sólida (SPE). En esta comparación se observa que ambas proporcionan un elevado nivel de "*clean-up*" en los extractos de suelos, un alto factor de concentración y una eficiente separación de los analitos en relación a la materia orgánica presente en las muestras de suelos. No obstante, el sistema de membrana líquida aporta mejores resultados globales ya que la fase receptora es un medio acuoso totalmente compatible con el método de detección por IP-HPLC y todos los analitos pueden ser extraídos y analizados en una única fracción. La técnica de extracción en fase sólida requiere la elución de los analitos en dos fracciones separadas y necesita volúmenes más elevados de disolventes orgánicos. SPE utiliza varios

mililitros de metanol para condicionar el adsorbente y eluir los analitos, mientras que la membrana de geometría de fibra hueca sólo utiliza unos pocos microlitros de éter dihexílico. Además, la geometría de fibra hueca proporciona límites de detección (0.1 µg·kg suelo^{-1}) inferiores a la extracción en fase sòlida (3-10 µg·kg suelo^{-1}).

Finalmente, en el **Capítulo 5** la metodología analítica desarrollada se ha aplicado al estudio de los procesos de adsorción y transporte de 2,4-D, MCPA y sus metabolitos fenólicos en suelos. En el laboratorio, el estudio de la adsorción se ha realizado mediante experimentos en "*batch*" que han permitido determinar las correspondientes isotermas de adsorción, y ensayos en columna. Los primeros estudios nos aportan las constantes de adsorción de cada analito según el ajuste a modelos teóricos. Los resultados para el modelo de Freundlich mediante un ajuste por regresión no lineal dan las constantes de Freundlich 0.62, 0.44 y 0.47 para el 2,4-D a tres profundidades de suelo y 0.77, 0.65 y 0.44 para MCPA en las mismas condiciones. Los ensayos en columna proporcionan información adicional sobre parámetros de adsorción y de desorción. Se concluye que el 2,4-D tiene una adsorción no instantánea, necesitando un tiempo elevado para alcanzar un equilibrio óptimo, y que, al mismo flujo, la desorción es un proceso más rápido que la adsorción. El 2,4-D presenta un tiempo de residencia inferior dentro de la columna cuando se encuentra conjuntamente con MCPA.

Con el objetivo de estudiar la dinámica de los herbicidas en condiciones reales, se ha llevado a cabo un experimento de campo. Se realizó una aplicación controlada del herbicida comercial Bi-Hedonal®, que contiene como ingredientes activos 2,4-D y MCPA y simultáneamente de un trazador, en una parcela de 100 m^2 situada en el campo de golf Serres de Pals, irrigada con agua regenerada. Las muestras de suelo son obtenidas del campo a diferentes profundidades y a diferentes intervalos de tiempo después de la aplicación del producto comercial para estudiar la movilidad y la degradación de los herbicidas fenoxiacéticos. Para el análisis de las muestras se opta por la extracción mediante membrana líquida soportada debido a las ventajas que presenta frente a la extracción en fase sólida, dadas las necesidades concretas de este estudio. Se observa que en el suelo más superficial (0-10 cm) los niveles más elevados de los herbicidas se obtienen el primer día después de la aplicación (34.1 µg·kg suelo^{-1} para 2,4-D y 17.4 µg·kg suelo^{-1} para MCPA). A partir del noveno día después de la aplicación ya no se observan más disminuciones destacables en los niveles de los dos

analitos y las concentraciones se mantienen entre 0.78 y 1.7 µg·kg suelo^{-1} para 2,4-D y 0.53 y 2.0 µg·kg suelo^{-1} para MCPA. A la profundidad intermedia se observa que en los primeros días después de la aplicación todavía no se alcanza el máximo de concentración de los dos ingredientes activos del herbicida (14.5 µg·kg suelo^{-1} para 2,4-D y 6.1 µg·kg suelo^{-1} para MCPA). Los niveles máximos se detectan el tercer día después de la aplicación (36.0 µg·kg suelo^{-1} para 2,4-D y 11.4 µg·kg suelo^{-1} para MCPA), coincidiendo con el descenso que se observa en suelos superficiales. Este hecho es debido al transporte rápido de 2,4-D y MCPA desde la fracción más superficial a la intermedia. A partir del sexto día ya no se detectan los dos analitos en la mayoría de los casos. En las muestras de suelo correspondientes a profundidad mayor (30-60 cm) no se detectan ninguno de los dos herbicidas en las muestras analizadas. La dilución de los analitos a medida que se van difundiendo a través del suelo, conjuntamente con su degradación, explica porqué no es posible detectarlos en esta fracción. Respeto a la degradación del 2,4-D y MCPA a sus metabolitos fenólicos, encontramos que el 2-MP se encuentra a concentración máxima (13.4 µg·kg suelo^{-1}) en el suelo de profundidad intermedia 14 días después de la aplicación del herbicida, pasando por concentraciones inferiores, hasta a 0.4 µg·kg suelo^{-1}, a profundidad de 30-60 cm el día 70 después de la aplicación. Los otros metabolitos fenólicos tienen un comportamiento similar.

SUMMARY

The control of herbicides and other organic pollutants present in the environment has become a routine practise in many laboratories since the establishment of legislations that indicates the maximum allowed levels for these compounds. For this reason, it is necessary to develop new analytical methodologies for the monitoring of organic compounds in the environment. These analytes are often found at trace levels in waters and soils, with a high humic and fulvic organic matter content associated. One of the most important challenges in this field is the sample treatment (i.e. extraction, concentration and clean-up of the compounds to obtain a correct quantification). These procedures have to be coupled to chromatographic techniques to allow the determination of the compounds.

This study is devoted to the development of a method for the determination of 2,4-D, MCPA and their phenolic metabolites and another method for the determination of caffeine. The first method has been applied for the monitoring of the herbicides and their metabolites in soils from a golf course; the second has been applied to the determination of caffeine in natural and urban wastewaters.

Ion-pairing liquid chromatography is the technique chosen for the determination of the acidic herbicides and metabolites, as it is not necessary a derivatization of the analytes previously to their analysis. These compounds can be analysed by UV-Visible detection due to the presence of aromatic rings in their structure. In **Chapter 2,** an ion-pairing liquid chromatographic method is developed for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) and their main chlorophenolic metabolites, 2-methylphenol (2-MP), 2-chlorophenol (2-CP), 4-chlorophenol (4-CP), 4-chloro-2-methylphenol (4-C-2-MP) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) in waters and, afterwards, in soils. The method uses a mobile phase containing 30% acetonitrile with 10 mM tetrabutylammonium hydroxide as the ion-pairing reagent, buffered to pH=7.2 with phosphoric acid, and detection at 230 nm. The time required for the separation of the analytes is less than 22 minutes, and the method presents good linearity. Detection limits are found to be in the $\mu g.L^{-1}$ range for all the analytes. For the determinations of caffeine (**Chapter 6**), a reversed-phase liquid

chromatography method is used. The mobile phase contains 20% acetonitrile with UV detection at 272 nm. The method is linear in the 4-1000 $\mu g.L^{-1}$ range, where the concentrations for samples from natural waters and wastewater treatment plants are expected. Detection limit for the proposed method is 1 $\mu g.L^{-1}$ of caffeine, while quantification limit is 4 $\mu g.L^{-1}$. The method presents good repeatability and reproducibility.

Most of the methods for the determination of organic pollutants need preliminary sample treatment for the preconcentration and clean-up of the analytes previously to the detection, as these compounds use to be present at trace levels and the chromatographic techniques are not sensitive enough. Solid-phase extraction (SPE) is one of the most applied techniques for this purpose due to its simplicity and large number of solid phases available. Different sorbents are evaluated in **Chapter 3** for the preconcentration and clean-up of the compounds of interest, as well as the study of the extraction of the analytes from soils. The analysis of soil samples requires an aggressive extraction step, which is not selective. Co-extraction of a large number of interferents together with the analytes takes place during the extraction step. A 0.01 M sodium hydroxide solution is used for the alkaline extraction of the analytes of interest. It yields adequate recoveries for all the compounds, and co-extracted amounts of humic and fulvic substances are low enough to allow an effective clean-up. Different solid phases have been evaluated, a C_{18} silica sorbent (ACCUBOND® II ODS), a polystyrene divinylbenzene resin (Amberlite XAD-2) and a polystyrene divinylbenzene sorbent (Bakerbond SDB-1). It is necessary to find the best sorbent taking into account the alkaline conditions of the soil extracts. Conventional silica sorbents can only be used if the extract is acidified before SPE extraction. The need to adjust the sample pH, however, introduces a new step in the treatment that results in an increased variability in the final result and longer analysis times. Polystyrene divinylbenzene sorbents can interact with aromatic analytes via π-π interactions, and it is no necessary for the protonated form of the analyte to be present to allow adsorption of the analyte. The polystyrene divinylbenzene sorbent (SDB-1) was found to be the best option for the quantitative determination of the seven compounds when soil samples are extracted with 0.01 M sodium hydroxide. It is not necessary to adjust the pH of the alkaline extract before the preconcentration and clean-up step with the use of this sorbent. A sample flow rate of 0.5 $mL \cdot min^{-1}$ is necessary for the analysis of 2,4-D and MCPA. This

can be explained by the higher polarity of these herbicides, making it necessary to increase the contact time between the analyte and the polystyrene sorbent. Two elution steps are needed for the quantitative elution. A first fraction, eluted with 5mL methanol:water (1:1), allows the quantitative recovery of 2,4-D (106±7 %) and MCPA (103±3 %). 2-CP and 4-CP are eluted in this fraction but with recoveries less than 100%. 2-CP is eluted at a percentage higher than 90% and 4-CP is only partially eluted (between 3-40% depending to the amount of adsorbed anayte). The others analytes (2-MP, 4-C-2-MP and 2,4-DCP) are no elutated in this fraction. These compounds needed a second elution with 4 mL of methanol 100%.

Caffeine (**Chapter 6**), has been preconcentrated with a conventional C_{18} silica sorbent (ACCUBOND® IIODS). Quantitative recoveries were obtained working with volumes of 100 mL and a concentration level of 0.1 $mg \cdot L^{-1}$, flow rates of 25 $mL \cdot min^{-1}$ and an elution volume of 2 mL of methanol were used. The detection limit obtained with this off-line procedure is 1000 $ng \cdot L^{-1}$. In order to improve this value, an on-line SPE-HPLC method was developed to increase the efficiency, sensitive and speed in the determination of caffeine. The on-line system yields quantitative recoveries (100 mg mini-column, elution volume of 300 µL, and a 25 to 100 $ng \cdot L^{-1}$ concentration range). The detection limit is 67 times lower with this system than with the off-line one. In order to evaluate the SPE-HPLC on-line procedure, natural water samples were analyzed. Afterwards, this methodology was applied to samples from wastewater treatment plants, with high organic matter content.

Besides solid-phase extraction, supported liquid membranes (SLM) are evaluated to improve the preconcentration and clean-up for 2,4-D, MCPA and phenolic metabolites (**Chapter 4**). SLM is selected for its selective extraction, efficient preconcentration, high recuperation factors, and it can be easily coupled on-line to a liquid chromatograph. In this study, a supported liquid membrane system coupled to HPLC has been developed for the determination of phenoxyacetic herbicides and their phenolic metabolites in soil samples. SLM has been studied in two different geometries: laminar and hollow fiber membranes. The effect of the organic solvent that impregnates membrane porous is evaluated with in the laminar geometry. Dihexyl ether was the best solvent, providing good recoveries for all analytes at 1 $mg \cdot L^{-1}$ level, using a donor phase of 200 mL of 0.1 M sulphuric acid and an acceptor phase of 200 mL of 0.01 M sodium

hydroxide. Working with the hollow fiber membrane system the preconcentration of the analytes can be achieved. Concentration factors of 2.2, 2.9, 4.4, 6.0 and 5.6 for MCPA, 2,4-D, 4-CP, 2,4-DCP and 4-C-2-MP, respectively, were obtained recirculating 50 mL of donor phase through the shell and 5 mL of acceptor phase through the lumen of the fiber for one hour. The hollow fiber geometry has been applied to the analysis of soil extracts in an on-line HFSLM-HPLC system. It has been found that the use of a 20 mL donor phase (soil extract spiked at pH=1) and 1 mL of acceptor phase (0.01 M sodium hydroxide) is the best choice. This system shows repeatability lower than 5 % and reproducibility lower than 8 %, expressed as relative standard deviations. The method is linear in the 1 to 25 $\mu g \cdot L^{-1}$ range (analysis of spiked extracts). Detection and quantification limits for all the compounds are 0.1 and 0.3 $\mu g \cdot L^{-1}$, respectively.

Supported liquid membrane in hollow fiber geometry as the preconcentration technique has been compared with solid-phase extraction. Both techniques give large preconcentration factors and efficient separations of the analytes with respect to the organic matter content present in the soil samples. However, SLMs provide better results as the acceptor phase is an aqueous solution compatible with the IP-HPLC method used for the analysis and all the analytes can be determined in a single fraction. SPE needs larger volumes of organic solvent than SLM. SPE uses some millilitres of methanol to condition the sorbent and to elute the analytes, while hollow fiber geometry only needs some microlitres of dihexyl ether. In addition, the hollow fiber liquid membrane system provides lower detection limits (0.1 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$) than solid-phase extraction (3-10 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$).

Finally, the developed analytical technology is applied in **Chapter 5** to the study of the adsorption and transport processes of 2,4-D, MCPA and phenolic metabolites in soils. Laboratory experiments such as the determination of adsorption isotherms and column tests, have been performed. The evaluation of adsorption isotherms, by adjusting experimental values to theoretical models, provide us the adsorption constants for the analytes. Freundlich adsorption constant values of 0.62, 0.44 and 0.47 for 2,4-D, in three different soil depths, and 0.77, 0.65 and 0.44 for MCPA were obtained by using non linear regression to adjust the experimental values to the Freundlich model. Column tests provide us additional information about adsorption and desorption parameters. 2,4-D shows a no instantaneous adsorption, needs a large time for optimal re-

equilibration, and the desorption is faster than the adsorption at the same flow rate. 2,4-D presents a lower residence time in the column in presence of MCPA.

With the aim to investigate the dynamics of the herbicides in real conditions, a field study has been performed. The commercial herbicide Bi-Hedonal®, which contains 2,4-D and MCPA as active ingredients, and a tracer were applied in a plot (100 m^2) of the golf course Serres de Pals. Soil samples are obtained from the second plot at different depths and different time intervals after the application of the commercial product to study the mobility and degradation of the phenoxyacetic herbicides. For the analysis of soil samples the supported liquid membrane methodology was chosen. For a superficial soil (0-10 cm), the larger concentrations of the herbicides were found one day after application (34.1 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for 2,4-D and 17.4 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for MCPA), with a decrease in the levels for the two compounds with time. After nine days, there was no more decreases in the concentrations of the two analytes, which were found to stand between 0.78 and 1.7 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for 2,4-D and between 0.53 and 2.0 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for MCPA. At intermediate depth, the maximum levels did not appear the first day after application (14.5 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for 2,4-D and 6.1 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for MCPA). The larger levels were detected the third day after application (36.0 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for 2,4-D and 11.4 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ for MCPA), which correlates with the decrease at superficial level. This fact is due to the fast transport of the polar 2,4-D and MCPA from the most superficial level to deeper levels. The two analytes were no detected in most of the cases after the day six. Neither of the two herbicides has been detected in soil samples at larger depth (30-60 cm). Dilution of the analytes through the soil and their degradation are the two factors that can explain why these compounds are not detected in this fraction. With regards to the degradation of 2,4-D and MCPA to their phenolic metabolites, 2-MP was found at its maximum level (13.4 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$) in intermediate soil 14 days after the herbicide application. The levels detected decreased with time (e.g. 0.4 $\mu g \cdot kg\ soil^{-1}$ at 30-60 cm, 70 days after application). Similar behaviour has been observed for all the other phenolic metabolites.

INTRODUCCIÓ GENERAL

CONTINGUTS CAPÍTOL 1:

1.1. COMPOSTOS D'INTERÈS.....23

1.1.1. HERBICIDES FENOXIACÈTICS.....23
1.1.1.1. Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D).....24
1.1.1.2. Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA).....27
1.1.1.3. Metabòlits fenòlics 29
1.1.2. CAFEÏNA.....32

1.2. MÈTODES D'EXTRACCIÓ I CONCENTRACIÓ.....34

1.2.1. EXTRACCIÓ LÍQUID-LÍQUID (LLE).....35
1.2.2. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE).....36
1.2.3. MICROEXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPME).....41
1.2.4. MEMBRANES LÍQUIDES.....42
1.2.5. EXTRACCIÓ SÒLID-LÍQUID (SLE).....45

1.3. TRANSPORT I DESTÍ DELS PLAGUICIDES EN EL MEDI AMBIENT.....46

1.4. REFERÈNCIES.....48

1.1. COMPOSTOS D'INTERÈS

Durant els darrers anys ha anat incrementant la preocupació per la contaminació del medi ambient i lligat a aquest fet ha sorgit la necessitat de disposar de tècniques i mètodes d'anàlisi que permetin avaluar i acotar aquesta contaminació ambiental. Aquest estudi s'ha centrat en el desenvolupament de metodologia analítica per al seguiment d'herbicides fenoxiacètics i cafeïna en el medi ambient.

1.1.1. HERBICIDES FENOXIACÈTICS

Un plaguicida es defineix com aquella substància o barreja que té per funció prevenir, destruir, repel·lir o mitigar qualsevol plaga [1]. Podem distingir diferents tipus de plaguicides en funció dels organismes sobre els que actuen: els insecticides (insectes), els fungicides (fongs), els herbicides (males herbes) i d'altres.

Els herbicides són compostos químics que alteren la germinació, creixement i comportament de les plantes. Els herbicides s'utilitzen per eliminar les males herbes que afecten les collites. Es classifiquen com a selectius quan afecten les males herbes però no al cultiu i com a no-selectius quan ataquen a tota la vegetació en general. Segons el mode d'actuació també es poden classificar en herbicides de contacte i sistèmics; els primers actuen directament sobre les parts de la planta on s'aplica l'herbicida i els

segons són adsorbits per les arrels o d'altres parts i circulen per tota la planta. Una altra classificació es pot fer en funció del moment d'aplicació: uns dies abans de plantar el cultiu, abans de l'aparició dels primers brots o després de que comencin a sorgir les plantes, tant els cultius com les males herbes. Es poden aplicar de manera que només cobreixen la línia on hi ha el cultiu, que abastin tota la zona, a zones molt concretes on hi ha les males herbes o directament sobre les males herbes.

El nombre d'herbicides en el mercat és molt elevat i amb propietats molt diverses. Es poden agrupar en funció de la seva estructura química en diferents famílies com els fenoxiàcids (e.g. àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D) i àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA)), els compostos bipiridínics (e.g. Paraquat i Diquat), els derivats de la urea (e.g. Linuron i Monuron), les triazines (e.g. Atrazina i Simazina), les amides (e.g. Alachlor), els carbamats i tiocarbamats (e.g. Tiobencarb) i d'altres [1]. Una de les famílies d'herbicides més utilitzades en els darrers temps són els fenoxiàcids (2,4-D i MCPA s'han escollit en aquest treball com a exemples típics d'aquesta família). Solen aplicar-se conjuntament amb agents segrestants o complexants d'ions de calci i magnesi per evitar la precipitació de les sals corresponents en presència d'aigües dures [2].

1.1.1.1. <u>Àcid 2,4-Diclorofenoxiacètic (2,4-D)</u>

Nom científic: Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic
Fórmula molecular: $C_8H_6O_3Cl_2$
Pes molecular: 221.04 $g \cdot mol^{-1}$
Solubilitat: en aigua: 900 $mg \cdot L^{-1}$ a 25 ºC
en dissolvents orgànics: es dissol bé en etanol, dietil éter, toluè i xilè.
Punt de fusió: 140.5 ºC
Coeficient d'adsorció: 20 $mg \cdot L^{-1}$ (valor estimat per a la forma àcida) [3].

L'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D) és un herbicida no selectiu que s'aplica per eliminar herbes de fulla ampla en la gespa, així com en cultius agrícoles i en camps de golf. La seva aplicació comporta un creixement anòmal del vegetal, amb un desenvolupament escàs de les arrels i un creixement excessiu de la tija. També s'observen sovint efectes de disminució de pigmentació degut a la reducció del contingut de clorofil·la [1]. És un dels ingredients actius en diferents productes

comercials, com Weedar®64, Hi-Dep® i Bi-Hedonal® (**Taula 1.1**). En la composició d'aquests herbicides s'inclouen components no actius, com tensioactius, que afavoreixen la dispersió regular en tota la zona d'aplicació. En el cas particular del 2,4-D els tensioactius més habituals són lauril sulfat sòdic, sulfonat d'alquilbenzè i Arquad 2HT-75® [2].

Taula 1.1. Composició d'alguns dels herbicides comercials acídics més utilitzats.

Nom comercial	Composició
Weedar®64 (líquid)	2,4-D en forma de sal de dimetilamina (46.8%) i inerts (53.2%)
Hi-Dep®(líquid)	2,4-D en forma de sal de dimetilamina (33.2%), 2,4-D en forma de sal de dietanol-amina (16.3%), etilenglicol (10%) i altres inerts (40.3%)
Bi-Hedonal®(líquid o sòlid)	barreja de 2,4-D (27.5%) i MCPA (27.5%) en forma de sal d'amina
Agritox® Dry 800	MCPA en forma de sal (80 $g \cdot L^{-1}$)
Agroxone®	MCPA en forma de sal o éster (750 $g \cdot L^{-1}$)
Banlene Plus®	MCPA

A la **Figura 1.1** es mostra l'estructura de l'herbicida 2,4-D en forma àcida. És tracta d'un herbicida amb caràcter hidrofílic, polar i amb una pressió de vapor elevada ($8 \cdot 10^{-6}$ mmHg [3]).

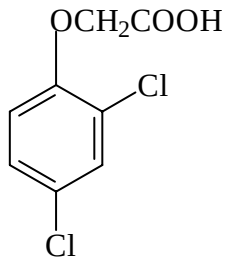
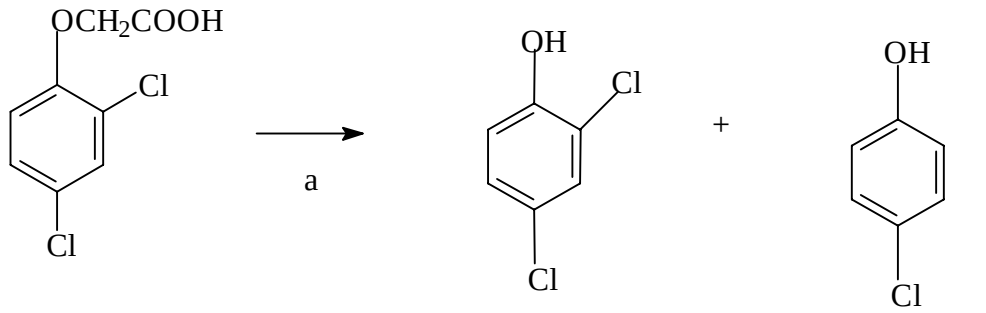


Figura 1.1. Estructura de l'herbicida 2,4-D en forma àcida.

Aquest compost és moderadament tòxic per ingestió (LD_{50} = 375-666 mg·kg^{-1} en rates). Per contacte amb la pell té uns índexs més elevats (LD_{50} = 1500 mg·kg^{-1} en rates i 1400 mg·kg^{-1} en conills). La seva toxicitat també és elevada en ocells, organismes aquàtics i en altres organismes (en el cas de les abelles no supera els 0.0115 mg·kg^{-1}). La inhalació de 2,4-D pels humans causa mucositats i falta de coordinació muscular, arribant a experimentar-se fatiga i nàusees. És molt perillosa l'exposició a través dels ulls i la pell, causant greus irritacions. Fins a l'actualitat no hi ha evidència de que tingui efectes cancerígens, teratogènics, mutagènics, ni que afecti a la reproducció [4].

Si la temperatura i la humitat del sòl són favorables per al desenvolupament dels microorganismes, el 2,4-D té una persistència molt baixa amb un temps de vida mitjana inferior a 7 dies. La transformació requereix pocs dies en climes càlids (temperatures d'uns 30 ºC), en terrenys que contenen un 30-35% d'humitat; mentre que és molt més lenta (persistència fins a un parell de mesos) en zones més fredes i eixutes [4]. Els microorganismes del sòl s'encarreguen de degradar-ho i, com a productes majoritaris, s'obté 4-clorofenol i 2,4-diclorofenol per mitjà de reaccions d'hidroxilació. Una via de degradació alternativa implica el trencament de l'enllaç éster, seguit de l'obertura de l'anell aromàtic, la pèrdua d'àtoms d'halogen i la β-oxidació de les cadenes àcides [1]. Dues possibles vies de degradació que s'han proposat són les que es mostren a la **Figura 1.2.**

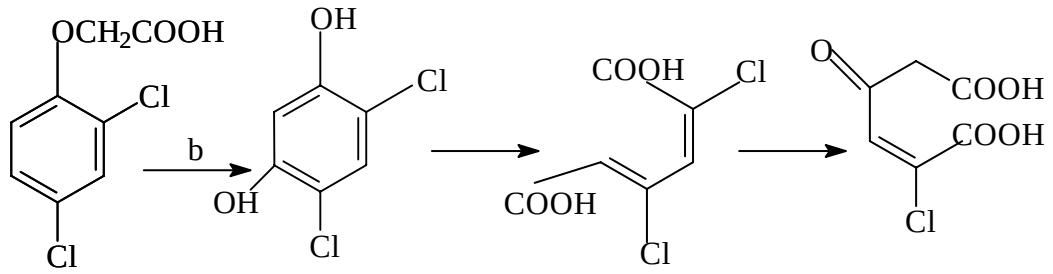
a) Degradació a 4-clorofenol i 2,4-diclorofenol.



2,4-D **2,4-diclorofenol** **4-clorofenol**

a: fong (*Aspergillus niger*).

b) Degradació a 3-oxo-5-cloro-4-hexendioic.



2,4-D 2,4-dicloro-1,5-difenol **3-oxo-5-cloro-4-hexendioic**

b: bacteri (*Artherobacter*)

Figura 1.2. Possibles vies de degradació del 2,4-D. (a) Degradació a 4-clorofenol i 2,4-diclorofenol, (b) Degradació a 3-oxo-5-cloro-4-hexendioic [1].

1.1.1.2. <u>Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA)</u>

Nom científic: Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic.

Fórmula molecular: $C_9H_6O_3Cl$

Pes molecular: 200.62 $g \cdot mol^{-1}$.

Solubilitat: en aigua: 825 $mg \cdot L^{-1}$ a 25 ºC.

en dissolvents orgànics: es dissol bé en éter, etanol, toluè, xilè i metanol.

Punt de fusió: 118-119 ºC.

Coeficient d'adsorció: 110 (valor estimat per la forma àcida) [4].

L'àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA) és un herbicida de la mateixa família que el 2,4-D, introduït l'any 1945 [4]. La similitud entre les estructures d'aquests dos compostos fa que la seva separació cromatogràfica sigui difícil. És un herbicida d'aplicació postemergència per a cereals, arròs, peres, patates, etc. Aquest herbicida és compatible amb el 2,4-D, dicamba, 4-cloro-2-metilfenoxipropiònic (MCPP), també de la mateixa família d'herbicides fenoxiacètics [4]. El MCPA és ingredient actiu en molts productes comercials, com Agritox® Dry 800, Agroxone®, Banlene Plus® i Bi-Hedonal® (**Taula 1.1**).

A la **Figura 1.3** s'observa l'estructura de l'herbicida MCPA en forma àcida.

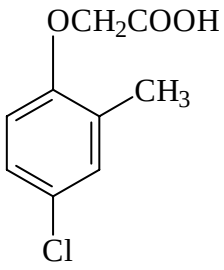


Figura 1.3. Estructura de l'herbicida MCPA en forma àcida.

El MCPA no és un herbicida gaire tòxic per ingestió (LD_{50} = 700-1160 mg·kg^{-1} en rates, aquestes poden eliminar una dosis individual en menys de 24 hores), ni per contacte amb la pell (LD_{50} = 4000 mg·kg^{-1} en conills), però sí que provoca irritació en contacte amb els ulls. Cal destacar efectes negatius en la reproducció de rates i gossos que sembla que no afecta a escala humana. En canvi, no hi ha evidència d'efectes cancerígens, teratogènics ni mutagènics. Pel que fa a la toxicitat sobre ocells és moderadament tòxic (LD_{50} = 377 mg·kg^{-1} en guatlles), contràriament als organismes aquàtics.

El MCPA té poca persistència en el sòl ja que és degradat ràpidament pels microorganismes. El temps de vida mitjana oscil·la entre 14 dies i un mes depenent del sòl i del contingut en matèria orgànica, però en sòls bàsics pot disminuir fins a 5 dies. És adsorbit ràpidament per la majoria de les plantes, on interfereix en la síntesi de les proteïnes, la divisió cel·lular i acaba atacant el seu mecanisme intern de creixement.

1.1.1.3. Metabòlits fenòlics

Els compostos fenòlics contenen un o més grups hidroxil units a un anell aromàtic, especialment a l'anell benzènic, com els monofenols o monohidroxibenzens (fenols), els difenols o dihidroxibenzens (pirocatecol, resorcinol, hidroquinona), els trifenols o trihidroxibenzens (pirogal·lol, hidroxihidroquinona, floroglucinol), etc.

De tots els compostos fenòlics, aquest estudi es centra únicament en els metabòlits fenòlics dels herbicides 2,4-D i MCPA. Aquests metabòlits són 2-metilfenol (2-MP), 2-clorofenol (2-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP) i 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). A la **Taula 1.2** es mostren les estructures i propietats físiques d'aquests compostos.

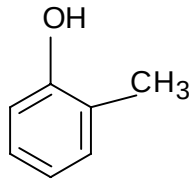
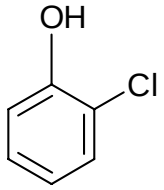
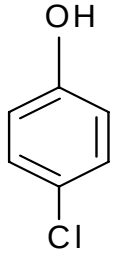
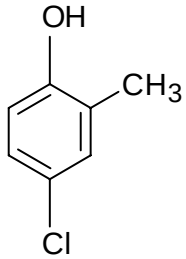
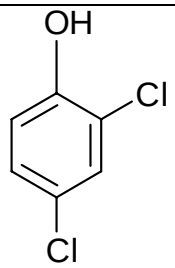
El 2-metilfenol (2-MP) és un líquid incolor o groguenc d'olor característica que vira a color fosc amb l'exposició a l'aire i a la llum. El 2-MP forma fums tòxics i reacciona violentament amb oxidants forts originant perill d'incendi i explosió. S'oxida fàcilment per exposició a l'aire. El 2-MP es pot adsorbir per inhalació, a través de la pell (tòxic a partir de 22 $mg \cdot m^{-3}$) i per ingestió. Per evaporació d'aquesta substància a 20ºC es pot arribar ràpidament a una concentració nociva a l'aire. És corrosiu per als ulls i la pell, a més pot causar efectes negatius en el sistema nerviós central i en varis òrgans [6].

El 2-clorofenol (2-CP) és in líquid incolor d'olor característica. Descompon en escalfar-lo intensament, produint uns fums tòxics i corrosius de clor i àcid clorhídric. També presenta perill de reacció amb oxidants. Aquesta substància irrita els ulls, la pell i el sistema respiratori [6].

El 4-clorofenol (4-CP) és un sòlid cristal·lí incolor d'olor característica. A l'igual que el 2-CP el vapor és més dens que l'aire i descompon en escalfar-lo, produint fums tòxics de clor i àcid clorhídric. S'adsorbeix per inhalació d'aerosols i a través de la pell causant irritació als ulls, pell, sistema respiratori, fetge, pulmons, ronyons i cor [6].

El 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP) és un sòlid cristal·lí que descomposa en encendre's i provoca fums tòxics i corrosius. Es pot adsorbir per inhalació, a través de la pell i per ingestió. La inhalació d'aquesta substància pot originar un edema pulmonar [6].

Taula 1.2. Propietats físiques i estructura dels metabòlits fenòlics: 2-metilfenol (2-MP), 2-clorofenol (2-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP) i 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)[7].

2-metilfenol	**Estructura**
Nom científic: Àcid o-cresílic (2-metilfenol, o-cresol o o-hidroxitoluè) Fórmula molecular: C_7H_8O Pes molecular: 108.2 $g \cdot mol^{-1}$ Solubilitat: en aigua: 25000 $mg \cdot L^{-1}$ a 25 ºC Punt de fusió: 31 ºC Punt d'ebullició: 191 ºC Pressió de vapor: 33 Pa a 25 ºC	
2-clorofenol	
Nom científic: 2-cloro-1-hidroxibenzè (2-clorofenol, o-clorofenol o 2-hidroxiclorobenzè) Fórmula molecular: C_6H_5ClO Pes molecular: 128.6 $g \cdot mol^{-1}$ Solubilitat: en aigua: 28500 $mg \cdot L^{-1}$ a 20 ºC Punt de fusió: 9 ºC Punt d'ebullició: 175 ºC Pressió de vapor: 230 Pa a 20 ºC	
4-clorofenol	
Nom científic: 4-cloro-1-hidroxiclorobenzè (4-clorofenol, p-clorofenol o 4-hidroxiclorobenzè) Fórmula molecular: C_6H_5ClO Pes molecular: 128.6 $g \cdot mol^{-1}$ Solubilitat: en aigua: 27000 $mg \cdot L^{-1}$ a 20 ºC Punt de fusió: 43 ºC Punt d'ebullició: 220 ºC Pressió de vapor: 13 Pa a 20 ºC	
4-cloro-2-metilfenol	
Nom científic: 4-cloro-2-metilfenol Fórmula molecular: C_7H_7ClO Pes molecular: 142.6 $g \cdot mol^{-1}$ Solubilitat: en aigua: 2300 $mg \cdot L^{-1}$ a 20 ºC Punt de fusió: 46-50 ºC Punt d'ebullició: 231 ºC Pressió de vapor: 27 Pa a 20 ºC	
2,4-diclorofenol	
Nom científic: 2,4-diclorofenol Fórmula molecular: $C_6H_4Cl_2O$ Pes molecular: 163.0 $g \cdot mol^{-1}$ Solubilitat: en aigua: 5000 $mg \cdot L^{-1}$ a 20 ºC Punt de fusió: 45 ºC Punt d'ebullició: 210 ºC Pressió de vapor: 133 kPa a 53 ºC	

El 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) és un sòlid cristal·lí incolor d'olor característica. El seu vapor també és més dens que l'aire i per combustió es produeix la formació d'un gas corrosiu (clorur d'hidrogen). Reacciona violentament amb oxidants forts emetent fums tòxics en cas d'un incendi. Es pot adsorbir per inhalació d'aerosols, a través de la pell i per ingestió. L'exposició a concentracions elevades d'aquesta substància pot produir intoxicació sistemàtica [6].

A part d'aquests metabòlits fenòlics que presenten com a màxim dos àtoms de clor es poden formar altres compostos amb un nombre més elevat d'àtoms de clor. Els clorofenols mostren una toxicitat creixent en augmentar el grau de cloració; així el pentaclorofenol és el compost més tòxic amb valors de LD_{50} entre 27 i 205 $mg \cdot kg^{-1}$ (aproximadament 2 grams per a una persona adulta) [8]. 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 esperaríem només tenint en compte el nombre de clors [6]. Els valors de LD_{50} per a clorofenols diferents de pentaclorofenol i per ingestió varien des de 89 $mg \cdot kg^{-1}$ per a 2,3,5,6-tetraclorofenol fins a 2960 $mg \cdot kg^{-1}$ per a 2,4,5-triclorofenol.

La procedència d'aquest compostos és d'origen natural però poden tenir un origen antropogènic i trobar-se en el medi ambient com a conseqüència, sobretot, de processos industrials, així com del seu ús com a plaguicides i/o bactericides. 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 seves propietats físiques i químiques. Els clorofenols es troben majoritàriament a l'aigua i al sòl, i en poca quantitat a l'aire (l'emissió de clorofenols a l'atmosfera representa només un 5% del total i aquestes emissions estan relacionades amb les fonts industrials de producció de clorofenols i amb la incineració de residus municipals). Són compostos que presenten una elevada adsorció en sòls, sobretot si són àcids i tenen un contingut alt en matèria orgànica, ja que són capaços de formar enllaços de tipus covalent amb els components del sòl [6]. Aquesta adsorció és més important per als compostos amb major nombre de clors, en tenir valors de coeficient de partició octanol-aigua més elevats i, conseqüentment, un caràcter més lipofílic. Els clorofenols també són adsorbits en sediments. 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'aquests compostos està relacionat amb la seva constant d'acidesa, així un valor de pK_a més elevat es

tradueix en una major dissociació i, en conseqüència, més tendència a romandre en el medi aquàtic [9].

A més d'experimentar processos físics tals com l'evaporació o l'adsorció, els clorofenols poden ser degradats a altres substàncies per mitjà de reaccions químiques o per acció de la llum o els microorganismes. Aquestes transformacions poden tenir lloc en temps variables, des de pocs dies fins a varis mesos, i els productes finals més habituals són CO_2, H_2O i ions Cl^-. Alguns productes finals són més tòxics que els propis clorofenols, per exemple les dioxines [9].

La degradació dels clorofenols està influïda per diversos paràmetres com el pH (e.g. la seva fotòlisi és més ràpida en condicions alcalines), la presència d'oxigen (e.g. 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 de la temperatura, la quantitat de nutrients i el contingut de matèria orgànica es tradueix en un increment de la biodegradació i degradació de clorofenols. També té una influència important la posició dels substituents clor a l'anell aromàtic, les substitucions en orto i meta són més reactives que en la posició para. El nombre d'àtoms de clor és inversament proporcional a la seva reactivitat [6].

1.1.2. CAFEÏNA

La 1,3,7-trimetilxantina (cafeïna) és l'últim dels compostos objecte d'estudi en aquest treball. En tenir un consum elevat és freqüent trobar-la en aigües que entren a les estacions depuradores d'aigües residuals urbanes i com a conseqüència pot ser present en les aigües superficials. La cafeïna és una substància alcaloide d'origen natural derivada de la xantina, de fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$. A la **Figura 1.4** es mostren les molècules de 1,3,7-trimetilxantina (cafeïna), 3,7-dimetilxantina (teobromina) i 1,3-dimetilxantina (teofil·lina); aquests tres alcaloides tenen una estructura bàsica comuna, la metilxantina. La cafeïna és àmpliament utilitzada, podent-se trobar en begudes, aliments i fàrmacs [10]. Es troba present en el cafè (1.5% del seu pes en sec), en les fulles de te (un 5%), en el mate i en la cola. S'estima un consum mitjà global de 70 $mg \cdot persona^{-1} \cdot dia^{-1}$, encara que els valors poden variar molt depenent del país [10]. Una tassa de cafè conté aproximadament 170 $mg \cdot L^{-1}$ de cafeïna mentre que una de cafè descafeïnat uns 10 $mg \cdot L^{-1}$. L'orina d'una persona que habitualment pren cafè conté aproximadament 3 $mg \cdot L^{-1}$.

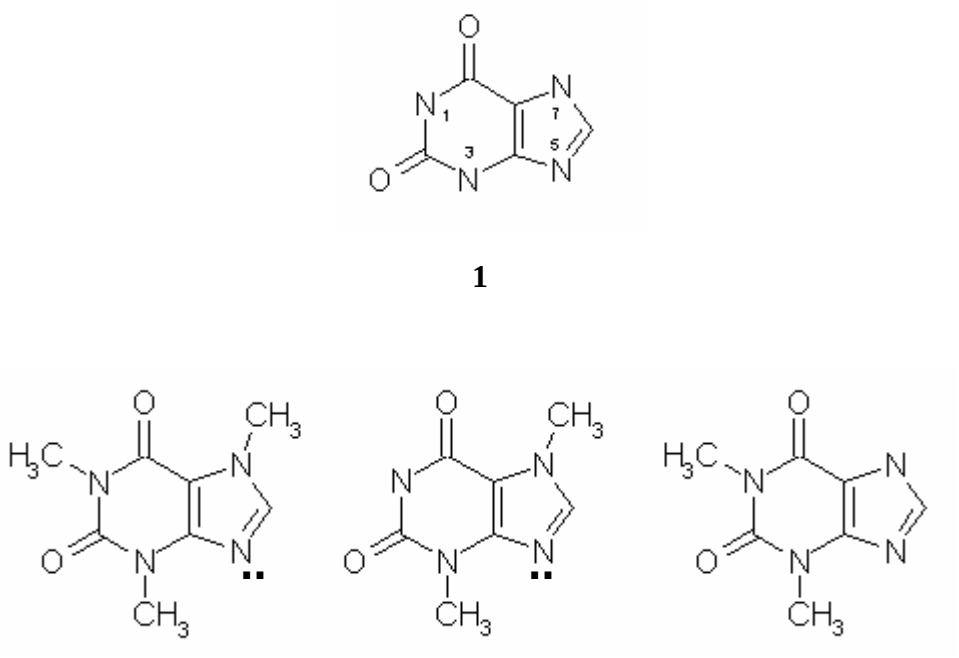


Figura 1.4. Molècula de dimetilxantina (1) i estructura dels seus tres derivats alcaloides més abundants: (2) 1,3,7-trimetilxantina (cafeïna), (3) 3,7-dimetilxantina (teobromina) i (4) 1,3-dimetilxantina (teofil·lina).

La cafeïna és transformada en el fetge humà en més de 20 metabòlits, principalment dimetilxantines, àcids dimetil i monometil úric i derivats d'uracil. Entre el 0.5% i el 10% de la cafeïna consumida s'excreta sense metabolitzar via orina. Existeixen estudis on s'avalua l'impacte de diferents compostos àmpliament utilitzats (fàrmacs, detergents, fragàncies, plaguicides i cosmètics entre d'altres) que arriben a les aigües superficials a través de les aigües residuals urbanes. Kolpin et al.[11] realitzen un seguiment de fàrmacs i altres contaminants orgànics, com la cafeïna i la 1,7-dimetilxantina com a producte de degradació de la mateixa. Als Estats Units d'Amèrica s'han estudiat fàrmacs, hormones i altres contaminants orgànics residuals en diferents rius, determinant que molts d'aquests compostos persisteixen fins arribar a aquests cursos d'aigua [12].

A la **Taula 1.3** es resumeixen les principals propietats de la molècula 1,3,7-trimetilxantina.

Taula 1.3. Principals característiques físiques de la cafeïna.

Cafeïna	
Nom científic	1,3,7-trimetilxantina
Fórmula molecular	$C_8H_{10}N_4O_2$
Pes molecular	194.19 $g \cdot mol^{-1}$
Solubilitat	Poc soluble en aigua freda i molt soluble en aigua calenta, cristal·litzant en forma de monohidrat. No és soluble en casi cap dissolvent orgànic, encara que té un alt grau de solubilitat en cloroform.
Punt de fusió	234-235 ºC
Punt de sublimació	178 ºC

1.2. MÈTODES D'EXTRACCIÓ I CONCENTRACIÓ

El desenvolupament d'un mètode analític implica diferents etapes, des del mostreig i tractament de la mostra fins a l'obtenció i tractament de dades. S'estima que dues terceres parts del temps total necessari per a una anàlisi correspon al tractament de la mostra. D'aquesta etapa en provindran la majoria dels errors associats al resultat final.

L'objectiu del tractament de la mostra és obtenir l'anàlit en l'estat més pur possible abans de procedir a la seva determinació instrumental. L'extracció té com a finalitat separar la substància o substàncies a determinar de la matriu (sòlida o líquida). En alguns casos l'extracció pot ser l'únic tractament necessari de la mostra abans de la seva anàlisi, mentre que per a mostres més complexes pot ser només un pas més d'un procés que implica vàries etapes. En anàlisi química pot ser necessària una etapa de purificació de la mostra ("*clean-up*") per tal d'eliminar compostos interferents en la detecció dels anàlits d'interès (e.g. coelució i detecció dels anàlits i dels interferents a la mateixa longitud d'ona en un detector UV-Visible).

La legislació europea és molt estricte respecte la presència de plaguicides en el medi ambient (límit de 0.1 $\mu g \cdot L^{-1}$) i, per tant, les concentracions que s'espera trobar

normalment al medi són molt baixes. Per aquest motiu calen mètodes d'anàlisi molt sensibles que permetin la monitorització d'aquests compostos a nivells baixos. Tot i el gran desenvolupament de les tècniques instrumentals, és freqüent que la seva aplicació directa no tingui una sensibilitat suficient per detectar i quantificar les baixes concentracions de l'anàlit que es requereixen. En aquests casos l'aplicació d'una tècnica d'extracció i concentració prèvia és indispensable abans d'utilitzar la tècnica instrumental disponible. La tècnica d'extracció a utilitzar dependrà de les característiques fisicoquímiques dels compostos a determinar i de les interferències potencials, així com de la tècnica instrumental escollida. A més, s'ha de tenir present que els anàlits d'interès hauran d'estar en un medi compatible amb el sistema analític de mesura, el que implicarà la presència de solvents volàtils per a cromatografia de gasos i miscibles amb la fase mòbil per a cromatografia líquida.

Generalment, les mostres aquoses requereixen poc tractament i "*clean-up*" en comparació amb les mostres de sòl o aliments, en alguns casos pot ser que no siguin necessaris cap dels dos tractaments.

1.2.1. EXTRACCIÓ LÍQUID-LÍQUID (LLE)

Quan la mostra a tractar és de naturalesa líquida la solució més habitual sol ser recórrer a la tècnica d'extracció líquid-líquid (LLE). És una tècnica de separació clàssica en la que s'hi posen en contacte dues fases líquides immiscibles i es basa en un procés de transferència d'una o vàries substàncies des d'una de les fases líquides (generalment aquosa) a l'altra (generalment orgànica). En aquesta tècnica, la mostra aquosa s'agita conjuntament amb un dissolvent orgànic. A continuació es separa la fase orgànica i, habitualment, s'evapora el dissolvent. L'extracció es pot dur a terme en un sol pas (extracció simple) o en diversos passos consecutius (extracció múltiple), sent aquesta darrera opció la més utilitzada ja que s'obté una millora considerable del rendiment de l'extracció [13].

Entre els avantatges que presenta aquesta tècnica tenim la seva simplicitat, la gran varietat de dissolvents disponibles i la possibilitat de modificar el pH o força iònica de la mostra per afavorir l'extracció d'un determinat tipus de compost. Per altra banda, LLE presenta desavantatges, s'utilitzen grans volums de dissolvents orgànics (e.g. hexà, diclorometà), els quals són cars i indesitjables per al medi ambient i de vegades són

també tòxics i inflamables; moltes vegades les mostres aquoses formen emulsions que dificulten la separació de fase i és una tècnica que no es pot automatitzar fàcilment.

LLE és útil per aquelles mostres on la matriu és complexa. Ha estat utilitzada per al pretractament i anàlisi de plaguicides i els seus metabòlits en begudes [14] i per a la determinació d'herbicides en mostres industrials [15] i en vins [16,17]. L'extracció líquid-líquid clàssica, usant dissolvents orgànics seguida d'evaporació fins a gairebé sequedat i el conseqüent anàlisi per GC, no és molt adient per a MCPA, 2,4-D i els seus derivats fenòlics a causa de la seva alta polaritat i solubilitat en aigua. Per això l'extracció líquid-líquid ha estat desplaçada per altres mètodes, com l'extracció en fase sòlida [18,19].

1.2.2. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE)

L'extracció en fase sòlida (SPE) es basa en la retenció de l'anàlit en una fase sòlida i la seva posterior elució amb un dissolvent adequat. Normalment, el volum de dissolvent necessari per aconseguir l'elució dels anàlits retinguts a la fase sòlida és molt inferior al volum de mostra aplicat, aconseguint factors de concentració elevats. Després del tractament adequat de l'extracte obtingut (evaporació total o parcial del dissolvent, redissolució i/o derivatització del solut), una alíquota és injectada en el sistema cromatogràfic.

La fase sòlida normalment es troba continguda dins un cartutx o columna de polietilè o vidre. Calen una sèrie d'etapes per a la correcta utilització de la SPE. En primer lloc és necessari condicionar el sorbent amb un dissolvent de propietats similars a la mostra. A continuació, es passa un volum determinat de mostra a través de la fase sòlida, on hi quedaran retinguts els anàlits. Posteriorment es realitza una etapa de rentat del sorbent per eliminar possibles interferències. Finalment, els anàlits són eluïts amb un volum petit d'un dissolvent adequat.

Existeix una gran varietat de fases sòlides disponibles i també és possible l'ús d'un ampli ventall de dissolvents per a l'elució. Les característiques de la tècnica la fan idònia per a l'extracció d'una gran varietat d'anàlits presents en mostres líquides i per a la purificació d'extractes. Encara que la SPE es desenvoluparà més extensament en el **Capítol 3**, es poden citar alguns avantatges que té aquesta tècnica en front a l'extracció líquid-líquid tradicional, com l'ús mínim de dissolvents orgànics, elevades recuperacions i factors de concentració, gran versatilitat i aplicabilitat degut al gran

nombre de fases sòlides existents i facilitat d'automatització i acoblament "*on-line*" amb les tècniques cromatogràfiques [20].

A continuació es comenten els diferents mecanismes d'adsorció dins la SPE. Bàsicament, existeixen tres mecanismes de separació i sorció on cadascun dels sorbents utilitzats tenen propietats i mecanismes d'interacció diferents: **fase normal, fase invertida i bescanvi iònic** [21] que són equivalents als mecanismes de separació que tenen lloc en cromatografia líquida. El principal problema associat al procés SPE és la baixa selectivitat, sobretot quan s'aplica a l'anàlisi d'aigües naturals. Per això, s'han desenvolupat altres tipus de sorbents que funcionen amb mecanismes diferents als tres indicats: SPE d'afinitat, SPE d'impressió molecular i SPE amb discriminació per mida de partícula.

És molt important entendre els mecanismes d'adsorció de SPE per ser capaç de desenvolupar un mètode efectiu per als anàlits d'interès. A més, a l'hora d'escollir el mecanisme d'extracció i separació és indispensable conèixer l'estructura dels anàlits i la matriu on es troben.

Extracció en fase sòlida de fase normal

La SPE en fase normal es refereix a l'adsorció d'anàlits en fases sòlides polars, per analogia amb la cromatografia líquida en fase normal. El mecanisme d'adsorció és una interacció polar, com ponts d'hidrogen, interaccions dipol-dipol i interaccions dipol-dipol induïdes. El mecanisme implica l'adsorció dels grups funcionals dels anàlits als punts polars del material adsorbent. L'adsorció per fase normal és una interacció baixa o moderadament forta.

Els tipus d'adsorbents que s'utilitzen per aquest tipus de mecanismes són fases no lligades de sílica, alúmina o silicat de magnesi (fluorisil) o també fases lligades de sílica del tipus aminopropil o cianopropil. L'aigua no es pot utilitzar com a dissolvent dels anàlits en SPE en fase normal ja que s'adsorbiria als punts actius de l'adsorbent i reduiria la interacció entre l'anàlit i aquests.

Típicament la SPE en fase normal s'utilitza per fer "*clean-up*" d'extractes orgànics de mostres d'aigua, aliments o altres materials. També s'utilitza per extreure anàlits de matrius orgàniques com olis.

Extracció en fase sòlida de fase invertida

Aquest mecanisme és el més habitual per a l'anàlisi d'aigües ja que implica la partició dels soluts entre una fase mòbil polar, tal com la dissolució aquosa on estan presents, i una fase sòlida no polar. El mecanisme d'adsorció és una interacció no polar, forces de Van der Waals, forces de dispersió o de partició. El mecanisme de partició és un procés de baixa energia (~5 $Kcal \cdot mol^{-1}$) i és anàleg al procés d'extracció d'una molècula que es separa d'una solució aquosa per extracció líquid-líquid. La diferència està en que la fase orgànica està químicament lligada a la matriu sòlida.

Els adsorbents més habituals són els de sílica modificada amb cadenes de C_8 i C_{18}. La superfície de les partícules de sílica és heterogènia amb una gran varietat de grups silanol. Els enllaços entre la fase de sílica i el residu apolar poden ser monofuncionals, si presenten un sol enllaç Si-O-Si, o trifuncionals, si contenen dues estructures Si-O-Si**.** La presència de grups Si-OH lliures a la superfície de la fase adsorbent poden provocar interaccions secundàries entre aquests grups i els anàlits. Per evitar això, i fer més hidrofòbica i uniformement no polar la base de sílica, es dóna el procés d'"*encapping*" en el qual es fa reaccionar la sílica derivatitzada amb trimetilclorsilà de manera que els grups Si-OH esdevenen $Si-(CH_3)_3$. En alguns casos, però, la presència d'aquests grups silanol lliures és intencionada i es parla d'adsorbents per a extracció en fase sòlida en mode mixt.

Un altre tipus d'adsorbents àmpliament utilitzats per a fase invertida són els de matriu polimèrica. Els més habituals són els de base de poliestirè entrecreuat amb divinilbenzè. Poden presentar diferent mida de partícula, diferent grau d'entrecreuament i diferent àrea superficial depenent del proveïdor, i, en general, tenen major capacitat que les fases de sílica degut al seu alt percentatge de carboni i una major hidrofobicitat. Els anells aromàtics de l'estructura permeten interaccions de tipus electró-donador i enllaços π-π, de manera que la unió anàlit-adsorbent és més forta i es dóna major retenció que en les fases de sílica modificada. A la vegada, els adsorbents polimèrics es poden dopar amb grups hidrofílics i així s'aconsegueix una millor interacció amb matrius aquoses i també una millor extracció d'anàlits polars i major selectivitat. En la majoria de casos no són productes comercials i cal sintetitzar-los a partir de la funcionalització de resines comercials no modificades [22].

Extracció en fase sòlida de bescanvi iònic

Aquest mecanisme implica el bescanvi iònic d'un anàlit ionitzat en un adsorbent de bescanvi iònic de càrrega oposada [21]. Aquesta reacció segueix la teoria clàssica del bescanvi iònic. El mecanisme d'extracció és una interacció iònica d'alta energia, per això els anàlits polars poden ser extrets de dissolvents polars, incloent aigua.

Els adsorbents s'anomenen bescanviadors aniònics o catiònics forts si tenen una càrrega permanent positiva o negativa, respectivament. Per exemple, un bescanviador catiònic d'àcid fort conté grups sulfònics ($-SO_3^-$) al final d'una cadena orgànica lligada a una matriu de sílica, o a un anell benzènic en el cas d'una matriu polimèrica. El mecanisme és similar en el cas dels aniònics, excepte que el punt de bescanvi aniònic fort és sovint un àtom de nitrogen quaternari carregat positivament amb un clorur com a contraió. La condició perquè es doni l'intercanvi és que l'anàlit també es trobi en forma iònica i haurà de competir amb altres ions presents a la mostra. La selectivitat del procés dependrà de l'afinitat de l'anàlit pel lloc actiu i del tamany dels ions que també competeixen pel mateix lloc.

Els adsorbents són de bescanvi iònic feble si la càrrega del bescanviador no és fixa, sinó que pot ser eliminada per variacions de pH. Si el pH de la mostra s'ajusta al pK_a de l'anàlit, molècules orgàniques d'àcid o base feble poden ser extretes mitjançant un mecanisme de bescanvi iònic. El valor de pK_a d'una molècula orgànica és un factor crític en la utilització de bescanviadors iònics.

Extracció en fase sòlida d'afinitat

Com ja s'ha indicat, el principal problema associat al procés d'extracció en fase sòlida és la baixa selectivitat, sobretot quan s'aplica a l'anàlisi d'aigües naturals. La matriu d'aquestes mostres és complexa i difícil d'eliminar. Això es tradueix en un elevat soroll de fons, sobretot a l'inici dels cromatogrames. La SPE d'afinitat utilitza immunosorbents que són anticossos específics enllaçats a sílica o altres tipus de matriu sòlida**.** El procés d'adsorció es torna més selectiu i la preconcentració i "*clean-up*" de les mostres té lloc en un sol pas. Actualment, però, hi ha pocs tipus d'immunosorbents disponibles comercialment, per la qual cosa els compostos que poden ser extrets aplicant aquesta tècnica és escàs i la major part d'aplicacions es troben en l'anàlisi de proteïnes i molècules biològiques [23].

Extracció en fase sòlida d'impressió molecular ("molecular recognition and molecular-imprinting solid-phase extraction")

Aquesta modalitat de SPE també es basa en el concepte d'afinitat però no utilitza anticossos. Una molècula plantilla es pot definir com un forat o un lloc actiu de la matriu polimèrica construït de tal manera que la seva forma i posició acomoda a un tipus d'anàlit determinat. Els polímers impresos es construeixen mitjançant la síntesi de polímers altament entrecreuats en presència d'una molècula plantilla, molècula similar a l'anàlit, de manera que posteriorment a la retirada de la plantilla, el polímer actua com a un medi de reconeixement i enllaç selectiu per a aquest compost.

Extracció en fase sòlida amb discriminació per mida de partícula ("restricted acces sorbents")

Aquest tipus de sorbents són partícules de sílica poroses en les quals la part interior dels porus està recoberta de cadenes hidrofòbiques tipus C_{18} mentre que a l'exterior abunden els grups polars. És una tècnica que s'utilitza, majoritàriament, per a l'anàlisi i "*clean-up*" de matrius complexes, tals com sèrum, sang o plasma, i combina dos mecanismes d'adsorció: per una banda el tamany de porus limita el nombre de molècules que poden entrar en contacte amb les cadenes de C_{18}, mentre que els compostos que aconsegueixen entrar dins els porus pateixen una retenció produïda per mecanismes hidrofòbics anàlegs als de fase invertida. Les interferències de major tamany presents en les matrius de sang o sèrum per a les que més s'aplica aquesta tècnica, les proteïnes, no poden entrar dins els porus ni interaccionen amb els grups exteriors de la fase de manera que passen sense patir cap mena de retenció.

Extracció en fase sòlida en mode mixt

Aquesta modalitat consisteix en treballar amb un sorbent que combina dos tipus de mecanismes. Generalment l'extracció en aquest mode implica fase invertida i bescanvi iònic.

SPE ha estat àmpliament utilitzada per a la determinació d'anàlits en mostres ambientals. S'han determinat herbicides conjuntament amb els seus principals

metabòlits (entre els quals es troben 2,4-D i MCPA) en aigües superficials [24-26]. D'Archivio et al. [25] determinen fins a 16 plaguicides (entre els quals es troba l'herbicida 2,4-D) emprant SPE en aigües subterrànies. També s'han realitzat estudis comparatius SPE "*on-line*" i "*off-line*" per herbicides acídics (2,4-D i MCPA) en aigües de diferents característiques [27,28]. També s'ha utilitzat SPE per tal de determinar clorofenols en vi [29] i en mostres d'aigua d'aixeta i de riu [30]. La cafeïna ha estat extensament determinada utilitzant SPE, tals com en els estudis de Verenitch et al. [31] conjuntament amb fàrmacs en aigües residuals, en mostres d'origen biològic [32], conjuntament amb fenols en mostres aquoses [33] i aigües residuals i de riu [34,35].

1.2.3. MICROEXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPME)

La microextracció en fase sòlida (SPME) és una variant de la SPE. Aquesta tècnica es basa en la partició d'un anàlit entre la fase adsorbent, immobilitzada en una fibra de sílice fosa, i la matriu que la conté. Les petites dimensions de la fibra fan que sigui possible muntar-la en un dispositiu semblant a una xeringa disponible comercialment. La fibra està unida a un èmbol, de forma que mitjançant el moviment d'aquest és possible treure la fibra a l'interior de l'agulla o deixar-la exposada a la mostra. Una vegada s'assoleix l'equilibri, ja sigui per immersió o per contacte amb l'espai en cap del vial que la conté, els compostos interaccionen amb el recobriment de la fibra i hi queden adsorbits. Posteriorment, són desorbits tèrmicament exposant la fibra al port d'injecció d'un GC o bé redissolent-los en un dissolvent orgànic si l'anàlisi es fa per HPLC.

La SPME aplicada a la determinació de plaguicides acídics (entre ells 2,4-D i MCPA) és descrita per Henriksen et al. [36]. 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 $\mu g \cdot L^{-1}$, mostrant-se útil en la determinació de fenols en aigües [37-38], en aigües residuals de matriu complexa amb alts nivells de contingut de matèria orgànica [39] i en sòls [40-41].

Una variant de la SPME convencional és la que aporta la utilització d'una nova geometria en la que l'adsorbent 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 clorofenols presents en aigües naturals [42], en vi [43, 44] i en mel [45]. La SPME ha estat utilitzada també per

a la determinació de cafeïna en mostres de te verd [46] i en mostres de plasma humà [47].

1.2.4. MEMBRANES LÍQUIDES

L'extracció i concentració mitjançant la tècnica de membranes líquides és una alternativa a l'extracció líquid-líquid tradicional. En aquest sistema els anàlits estan inicialment en una fase aquosa de càrrega i són transportats a una segona fase aquosa receptora. El transport es realitza a través d'una dissolució orgànica impregnada en una membrana polimèrica que actua com a suport. És una tècnica que combina extracció i retroextracció en un sol pas. En el **Capítol 4** s'explicarà àmpliament la concentració mitjançant membranes líquides i les seves aplicacions més significatives.

Una membrana es pot definir com una barrera semipermeable entre dues fases que ha d'actuar de barrera, limitant el moviment de les molècules a través seu d'una manera específica [48]. La membrana restringeix el moviment de les molècules mitjançant diferents mecanismes, com exclusió per tamany, diferències de coeficients de difusió, càrrega elèctrica i diferències de solubilitat, entre altres. És important tenir present que la separació per mitjà d'una membrana és un procés cinètic i la separació s'assoleix per l'efecte d'una força impulsora, no per l'equilibri entre fases. Aquestes forces impulsores poden provenir de gradients de pressió, potencials químics, potencials elèctrics o variacions de temperatura. A més d'aquesta força impulsora, la membrana en si mateixa determinarà el tipus d'aplicació, que pot variar des de la separació de partícules microscòpiques fins a la separació de molècules de mida similar [49].

Les membranes líquides són les formades per un líquid que separa dues fases líquides o gasoses, normalment es tracta d'una dissolució orgànica entre dues fases aquoses. El sistema consisteix en una primera fase aquosa, anomenada *solució de càrrega*, on inicialment hi ha presents les espècies químiques que cal separar, i una segona fase aquosa, anomenada *solució receptora o de retroextracció*, on es recuperen els anàlits després del seu transport a través de la dissolució orgànica (membrana). Així, en un sol pas es combinen l'extracció i la recuperació dels anàlits.

El transport a través de la membrana líquida es pot produir mitjançant els mecanismes de transport passiu i transport facilitat. El transport passiu es basa en processos de dissolució-difusió-dissolució de les espècies i, per tant, és limitat. En el transport facilitat, la membrana líquida està constituïda per una dissolució orgànica d'un

reactiu transportador ("*carrier*") que, mitjançant la formació d'una espècie neutre amb l'espècie que s'ha de separar en la fase membrana, facilita el seu pas a la fase receptora. Mitjançant aquest mecanisme, l'espècie que s'ha de separar pot ser transportada a través de la membrana en contra del seu gradient de concentració. El que interessa és trobar un transportador que sigui el més selectiu possible per a l'anàlit d'interès. D'aquesta manera el transportador ens proporcionarà un augment de la selectivitat i la permeabilitat. Un dels paràmetres que s'utilitza per caracteritzar el procés de separació amb membranes líquides és l'eficiència d'extracció (E) [50] que es defineix com la fracció de molècules d'anàlit que es recuperen a la fase receptora:

$$E = \frac{V_A C_A}{V_S C_S}$$

on V_A i C_A són el volum i la concentració a la fase receptora i V_S i C_S a la fase de càrrega.

El sistema en tres fases en que constitueix una membrana líquida pot adoptar diferents configuracions: membranes líquides de volum, membranes líquides emulsionades i membranes líquides suportades (**Figura 1.5**).

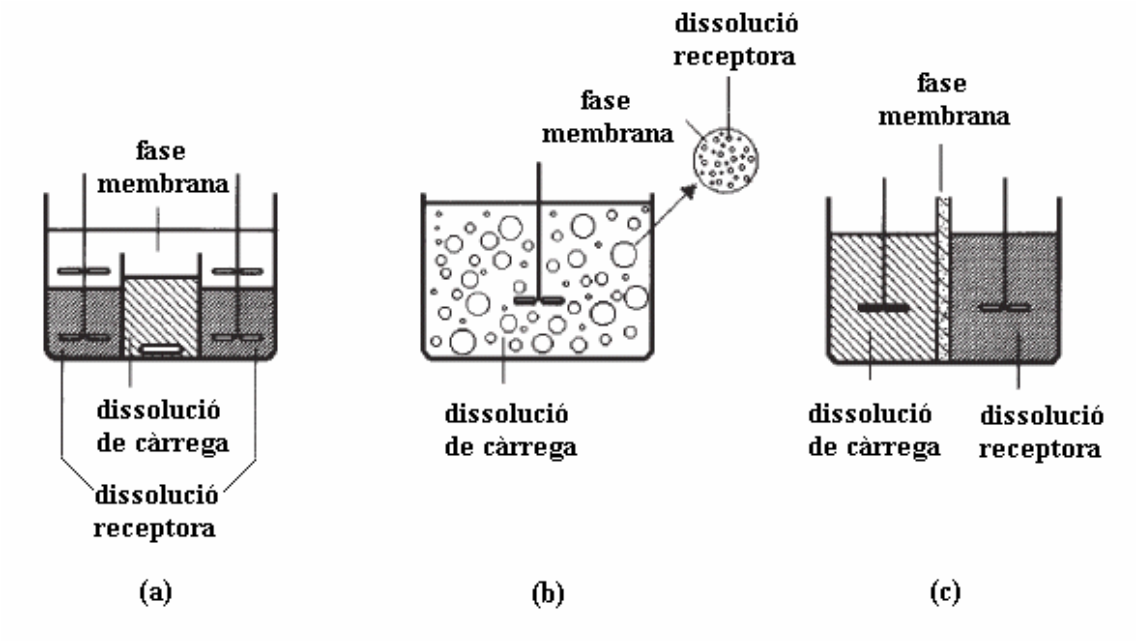


Figura 1.5. Configuracions de membranes líquides: (a) membrana líquida de volum, (b) membrana líquida emulsionada, (c) membrana líquida suportada.

Membranes líquides de volum (BLM)

En aquesta configuració, les dissolucions de càrrega i retroextracció estan separades per la fase membrana que és un líquid immiscible, contingut tot en un tub en forma de U o en vasos concèntrics. Les BLM es caracteritzen pel fet d'utilitzar un volum de fase orgànica relativament gran. Normalment s'apliquen quan cal emprar dissolvents orgànics molt volàtils i s'utilitzen dissenys adients per evitar pèrdues per volatilitat del dissolvent. També són de gran utilitat en sistemes on es produeix la formació d'una tercera fase a causa del volum elevat de fase orgànica. Aquesta configuració també es sol utilitzar per estudiar les propietats de transport de noves molècules portadores [51].

Membranes líquides emulsionades (ELM)

Aquest tipus de membranes es preparen afegint una solució aquosa a una solució orgànica que conté un tensioactiu adequat, formant una emulsió ("*water-in-oil*") que es barreja amb una segona dissolució aquosa. Normalment, la dissolució aquosa continguda a l'interior de l'emulsió és la de retroextracció i té un volum deu vegades inferior al de la fase de càrrega. El problema principal és l'estabilitat de l'emulsió, el que dificulta la recuperació del solut. Per això, les seves aplicacions són limitades.

Membranes líquides suportades (SLM)

En aquest cas, la fase orgànica, s'immobilitza mitjançant forces capil·lars en els porus d'un suport sòlid microporós. Aquesta estructura separa les dues dissolucions aquoses (la de càrrega i la de retroextracció). A escala de laboratori una geometria molt emprada és la laminar, però a escala industrial és més adequada la geometria de fibra buida ("*hollow fiber*") i l'espiral. Si el volum de la fase receptora és inferior al volum de la fase de càrrega és possible preconcentrar el compost d'interès.

Les SLM han estat aplicada a l'extracció i preconcentració d'herbicides acídics [52,53]. Concretament s'han aplicat per el 2,4-D i MCPA en l'estudi realitzat per [52] i també s'ha determinat 2,4-D en llet bovina en geometria de fibra buida [54]. S'ha utilitzat SLM per determinar cafeïna en mostres de te i cafè [55], i derivats fenòlics [56].

1.2.5. EXTRACCIÓ SÒLID-LÍQUID (SLE)

L'extracció sòlid-líquid (SLE) consisteix en posar en contacte una quantitat determinada d'una mostra sòlida amb un dissolvent apropiat per dissoldre quantitativament el compost a extreure. Les tècniques més utilitzades amb aquest finalitat són:

- *Agitació*: És un procediment senzill i suau en el que es sotmet a agitació manual o mecànica la barreja de la mostra i el dissolvent. L'eficiència de l'agitació pot ser millorada utilitzant radiació d'ultrasons. Un cop finalitzat el procés, el dissolvent que conté l'anàlit es separa de la matriu sòlida mitjançant filtració. En general, prèviament a la determinació final s'evapora el dissolvent per aconseguir una concentració dels anàlits.

- *Extracció "Soxhlet"*: En aquesta tècnica la mostra es posa en contacte de forma contínua amb dissolvent "fresc" condensat procedent d'un matràs de destil·lació. Aquest procés es repeteix fins aconseguir l'extracció quantitativa de l'anàlit (habitualment s'aconsegueix en un interval de temps entre 12 i 24 hores). Donat que s'utilitza un volum elevat de dissolvent serà necessària l'evaporació posterior del mateix. Mitjançant l'extracció "*Soxhlet*" es pot aconseguir la recuperació de compostos orgànics fortament units a la matriu, el que no és possible amb tècniques més suaus. No obstant, aquesta tècnica només és aplicable a anàlits que siguin estables a la temperatura de reflux del dissolvent.

- *Extracció assistida per microones*: La mostra sòlida es col·loca en un recipient de tefló (normalment tancat) junt amb el dissolvent i es sotmet a radiació de microones. S'aconsegueix una extracció eficaç en un temps curt. Els equips comercials disponibles permeten un control de temperatura, pressió i de potència de la radiació que són els paràmetres a optimitzar.

- *Extracció accelerada amb dissolvent*: Aquest sistema utilitza dissolvents a pressió i temperatura elevades per tal d'aconseguir extreure els anàlits d'una matriu sòlida de forma eficaç. El principal inconvenient d'aquest tipus d'extracció és el requeriment d'un equip especialment dissenyat per a aquesta finalitat [19].

L'extracció sòlid-líquid s'ha aplicat per a la determinació de plaguicides en aigües superficials [57] i fruites cítriques [58], compostos fenòlics en fulles de *Ficus carica* [59] i en cremes cosmètiques i emulsions similars [60], cafeïna en residus de te [61].

1.3. TRANSPORT I DESTÍ DELS PLAGUICIDES EN EL MEDI AMBIENT

El transport i destí dels plaguicides en el medi ambient ve influenciat per nombrosos factors que determinen la seva persistència i mobilitat. La interacció dels plaguicides amb sòls, aigües superficials i aigües naturals és un mecanisme complex i està controlada per molts processos simultanis, biològics, físics i químics [62]. La naturalesa del plaguicida i el medi en el que es troba determinaran la seva mobilitat. El transport des del moment de la seva aplicació implica diferents processos que inclouen rentat del sòl, degradació, lixiviació, sorció i volatilització entre altres.

L'adsorció en el sòl és una característica fisicoquímica molt important que determina en gran mesura el destí dels herbicides en el medi ambient. Encara que aquesta aplicació es faci sobre les fulles de la planta, l'herbicida acaba essent incorporat al sòl i en aquest medi té lloc una partició entre la fase aquosa i la líquida del sòl. El grau en que la molècula d'herbicida prefereix una o altra fase afectarà qualsevol altre aspecte del seu comportament en el sòl: la sorció determinarà si el plaguicida persistirà o no, si serà transportat i es convertirà en un contaminant (especialment en les aigües subterrànies).

Els sòls són mescles complexes i heterogènies de partícules poroses d'una gran varietat de mides i composició. Nombrosos estudis han analitzat el comportament de plaguicides en sòls com a combinació de les interaccions amb els seus comportaments individuals però l'èxit d'aquesta aproximació és limitat [63,64]. Quan es vol conèixer el grau de sorció per un plaguicida en concret i en un sòl determinat l'aproximació ha de ser empírica, la seva mesura experimental. Una mesura de la sorció és la constant de distribució (k_d). Per a la mesura directa d'aquest paràmetre es realitzen experiments en "*batch*" normalment en condicions d'equilibri entre fases aquoses contenint diferents concentracions de plaguicida i una determinada quantitat de sòl. Així, valors elevats de k_d (de l'ordre de 100 o més) indiquen que el plaguicida és adsorbit fortament i no serà mòbil en el sòl.

Els estudis d'adsorció en discontinu constitueixen una de les tècniques més freqüents que s'utilitzen en la caracterització de l'adsorció de compostos orgànics [65], encara que tinguin inconvenients com:

1) predomini de la fase líquida sobre la sòlida.
2) l'assaig es realitza en sistema tancat que pot provocar processos secundaris degut a l'elevat temps de contacte entre el solut i el líquid.
3) no es produeix un procés de suspensió de partícules col·loïdals de manera uniforme.
4) la superfície de contacte sòlid-líquid és major en l'assaig discontinu que en els assaigs de flux o en condicions reals, doncs les partícules estan nedant en un medi aquós. El procés d'agitació de l'assaig facilita la separació de les partícules sòlides.
5) no es produeix el procés de dispersió com passa en sistemes en flux continu.
6) la separació de la fracció líquida de la sòlida moltes vegades són dependents del sistema de separació i de l'operari.
7) les condicions ambientals establertes durant el temps d'agitació són alterades en posar-se en contacte amb el medi ambient per realitzar la separació de les dos fases.

La mesura del transport del plaguicida en una columna de sòl (empaquetada o obtinguda inalterada), en condicions de flux, proporciona informació més detallada de la mobilitat del compost i òbviament és més propera a les condicions reals. En aquests experiments es treballa amb sistemes on l'anàlit és afegit i eliminat contínuament del sistema. El control de les condicions hidrodinàmiques del sistema, és a dir el flux, és molt important. Per avaluar el sistema es poden realitzar assaigs previs amb un traçador no retingut pel sòl, que pugui ser analitzat fàcilment en continu. En aquests estudis la fase sòlida està interaccionant amb una gran quantitat d'anàlit, però amb una estreta relació anàlit/dissolució si es compara amb els mètodes en discontinu. Per tant, aquesta metodologia reprodueix d'una forma més adequada el transport sota condicions reals en el camp. Tot i això, encara que els dos mètodes presentin avantatges i inconvenients, ambdós proporcionen informacions complementàries.

En els estudis realitzats en aquest treball, paral·lelament als experiments de laboratori es va realitzar un estudi de camp. Aquest té com a objectiu obtenir informació del transport dels herbicides en condicions reals. Es va realitzar una aplicació controlada del producte comercial Bi-Hedonal® en una parcel·la del camp de golf "*Serres de Pals*" i es procedí a realitzar els diferents assaigs de laboratori per tal de determinar els anàlits en cada mostra de sòl.

1.4. REFERÈNCIES

1. E. Pramauro, "Els pesticides i el medi ambient", Servei de Publicacions, Universitat de València (Espanya), 1990, ISBN 84-370-0680-5.
2. K.K. Fox, L. Chapman, J. Solbé, Wirral, V. Brennanad, Tenside Surf., 34 (1997), 436.
3. A.G. Hornbby, R.D. Wauchope, A.E. Herner, "Pesticide properties in the environment", Springer, Nova York, NY (USA), 1996, ISBN 0-387-94353-6.
4. WHO, Environmental Health Criteria 84, "2,4-D", World Health Organization, Ginebra (Suïssa)(1984), ISBN: 92-4-154284-5.
5. C.S. Helling, "Pesticide mobility in soils II. Applications of soil thin layer chromatography", 35, Soil Sci. Soc. Am. Proc., (1971), 737.
6. WHO, "Environmental Health Criteria 93", "Chlorophenols other than pentachlorophenol", Word Health Organization, Ginebra (Suïssa), 1989, ISBN 92-4-154293-4.
7. "Handbook of Chemistry and Physics", CRC Press, Inc, Boca Raton, Fl, (USA), ISBN 0-8493-0740-6.
8. WHO, "Environmental Health Criteria 71", "Pentachrorophenol", World Health Organizatiom, Ginebra (Suïssa), 1987, ISBN 92-4-154271-3.
9. M. Czaplicka, J. Chromatogr. A, 322 (2004), 21.
10. I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H-R. Buser, Environ. Sci. Technol., 37 (2003), 691.
11. D.W. Kolpin, M. Skopec, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, Sci. Total Environ., 328 (2004), 119.
12. D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol., 36 (2002), 1202.
13. M. Valcárcel, A. Gómez, "Técnicas Analíticas de Separación", Reverté, Barcelona (Espanya), 1994, ISBN: 84-291-7984-4.
14. F.E. Ahmed, TRAC-Trend Anal. Chem., 29 (2001), 649.
15. B.M. Mahara, J. Borossay, K. Torkos, Microchemical Journal, 58 (1998), 31.
16. S.M. Abreu, P. Caboni, P. Cabras, A. Alves, V.L. Garau, J. Chromatogr. A, 1103 (2006), 362.
17. K. Tasev, I. Karadjova, S. Arpadjan, J. Cvetkovic, T. Stafilov, Food Control, 17 (2006), 484.
18. J.R. Dean, "Extraction methods for environmental analysis", John Willey & Sons, Chichester (UK), 1999, ISBN: 0-471-98287-3.
19. C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal, "Toma y tratamiento de muestras", Síntesis, Madrid (Espanya), 2002, ISBN: 8477389624.
20. R. Reeve, "Introduction to environmental analysis", John Willey & Sons, Chichester (UK), 2002, ISBN: 0-471-49295-7.
21. E.M. Thurman, M.S. Mills, "Solid-phase extraction. Principles and practice", John Willey & Sons, Nova York, NY (USA), 1998, ISBN: 0-471-61422-X.
22. M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, J. Chromatogr. A, 902 (2000), 3.
23. A. Houben, E. Meulenberg, T. Noij, C. Gronert, P. Stoks, Anal. Chim. Acta, 399 (1999), 69.

24. A. Laganà, A. Bacaloni, I.D. Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta, 462 (2002), 187.
25. A.A. D'Archivio, M. Fanelli, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Talanta, en premsa.
26. M. Vink, J.M. Poll, J. Chromatogr. A, 733 (1996), 361.
27. S. Chiron, E. Martinez, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 665 (1994), 283.
28. J.V. Sancho-Llopis. F. Hernández-Hernández, E.A. Hogendoorn, P. Van Zoonen, Anal. Chim. Acta, 283 (1993), 287.
29. A. Martínez-Uruñuela, I. Rodríguez, R. Cela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, Anal. Chim. Acta, 549 (2005), 117.
30. Y-q. Cai, Y-e. Cai, S-f. Mou, Y-q. Lu, J. Chromatogr. A, 1081 (2005), 245.
31. S.S. Verenitch, C. J. Lowe, A. Mazumder, J. Chromatogr. A, 1116 (2006), 193.
32. K.A. Georga, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, J. Chromatorgr. B, 759 (2001), 209.
33. J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou, J. Chromatogr. A, 904 (2000), 171.
34. T. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, J. Chromatogr. A, 938 (2001), 175.
35. J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón, Anal. Chim. Acta, 550 (2005), 116.
36. T. Henriksen, B. Svensmark, B. Lindhardt, R.K. Juhler, Chemosphere, 44 (2001), 1531.
37. M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A, 963 (2002), 137.
38. A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcè, J. Chromatogr. A, 953 (2002), 79.
39. A. Ribeiro, M.H. Neves, M.F. Almeida, A. Alves, L. Santos, J. Chormatogr. A, 975 (2002), 267.
40. M-R. Lee, Y-C. Yeh, W-S. Hsiang, B-H. Hwang, J. Chromatogr. A, 806 (1998), 317.
41. X. Li, Z. Zeng, J. Zhou, Anal. Chim. Acta 509 (2004), 27.
42. S. Nakamura, S. Daishima, J. Chromatogr. A, 1038 (2004), 291.
43. A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez, M.R. Salinas, J. Chromatogr. A, 1033 (2004), 173.
44. S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó, J. Chormatogr. A, 1047 (2004), 15.
45. N. Campillo, R. Peñalver, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A, en premsa.
46. J.A.B. Baptista, J.F.d.P. Tavares, R.C.B. Carvalho, J. Food Comp. Anal., 12 (1999), 273.
47. Y. Fan, Y-Q. Feng, S-L. Da, Z-G. Shi, Anal. Chim. Acta, 523 (2004), 251.
48. R.D. Noble, Sep. Sci. Technol. 22 (2-3)(1987), 731.
49. M. Mulder, "Basic principles of membrane technology", Kluwer Academic Pub., Dordrecht (Holanda), 1991, ISBN: 0-79234247-X.
50. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, TRAC-Trends Anal. Chem., 18 (5) (1999), 318.
51. R.W. Baker, I. Blume, "Coupled transport membranes", en "Handbook of industrial membrane technology", M.C. Porter (Ed.), Noyes Publications, New Jersey, NJ (USA) (1990), ISBN: 0-8155-1205-8.
52. M. Knutsson, G. Nilve, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, J. Agric. Food Chem., 40 (1992), 2413.
53. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, Trends Anal. Chem., 11(3)(1992), 106.
54. L. Zhu, K. Huey Ee, L. Zhao, H. Kee Lee, J. Chromatogr. A, 963 (2002), 335.
55. M. Zougagh, A. Ríos, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta, 539 (2005), 117.

56. M. Knutsson, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, Chromatographia, 42 (3-4)(1996), 165.
57. A. Claver, P. Ormad, L. Rodríguez, J.L. Ovelleiro, Chemosphere, en premsa.
58. C. Soler, J. Mañes, Y. Picó, J. Chromatogr. A, 1088 (2005), 224.
59. D.M. Teixeira, R.F. Patao, A.V. Coelho, C.T. da Costa, J. Chromatogr. A, 1103 (2006), 22.
60. M. Padilla, M. Palma, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A, 1091 (2005), 83.
61. A. Senol, A. Aydin, J. Food Eng., 75 (2006), 565.
62. P.S.C. Rao, C.A. Bellin, M.L. Brusseau, "Coupling biodegradation of organic chemicals to sorption and transport in soils and aquifers: paradigms and paradoxes", en "Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil", D.M. Linn, T.H. Carski, M.L. Brusseau, F.H. Chang (Eds.), SSSA Special Publication nº 32, Madison, WI (USA), 1993, 1, ISBN: 0-89118-803-7.
63. M. Gavrilescu, Eng. Life Sci., 5 (6) (2005), 497.
64. R.D. Wauchope, S. Yeh, J.B.H.J. Linders, R. Kloskowski, K. Tanaka, B. Rubin, A. Katayama, W. Kördel, Z. Gerstl, M. Lane, J.B. Unsworth, Pest. Manag. Sci., 58 (2002), 419.
65. A.E. Smith, G.P. Lafond, "Effects of long-term phenoxyalkanoic acid herbicide field applications on the rate of microbial degradation" en "Enhanced biodegradation of pesticides in the environment", K.D. Racke, J.R. Coats (Eds.), American Chemical Society, Miami, FL (USA), 1990, ISBN: 084121784-X.

OBJECTIUS

1.5. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi és el desenvolupament de metodologies analítiques que permetin fer el seguiment d'herbicides fenoxiacètics i cafeïna en el medi ambient. Per tal d'aconseguir aquests propòsits, l'estudi s'ha desglossat en l'assoliment dels objectius següents:

1.- Desenvolupar un mètode cromatogràfic basat en la cromatografia líquida per parell iònic per a la determinació conjunta dels herbicides 2,4-D i MCPA i els seus metabòlits fenòlics (2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) en aigües i sòls.

2.- Avaluar sorbents de diferents característiques per a la concentració dels herbicides fenoxiacètics i els seus metabòlits i per al "*clean-up*" d'extractes de sòls.

3.- Desenvolupar un sistema de membrana líquida suportada (SLM) per a l'extracció conjunta de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics en extractes de sòls. Realitzar l'acoblament "*on-line*" del sistema de membrana líquida en geometria de fibra buida amb el mètode cromatogràfic.

4.- Comparar les dues tècniques de concentració i "*clean-up*" (extracció en fase sòlida (SPE) i membranes líquides suportades (SLM)) per a la determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics en mostres de sòl.

5.- Aplicar la metodologia analítica desenvolupada a l'estudi de l'adsorció i transport de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics en sòls. Determinar les isotermes d'adsorció per els herbicides fenoxiacètics i estudiar las seva mobilitat al laboratori mitjançant experiments amb columnes de sòl. Estudiar el comportament d'aquests compostos en condicions reals mitjançant l'aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal® en una parcel·la del camp de golf "Serres de Pals".

6.- Desenvolupar un mètode per a la determinació de cafeïna mitjançant cromatografia líquida en fase invertida per a l'anàlisi d'aigües.

7.- Desenvolupar un mètode d'extracció en fase sòlida per la concentració de cafeïna i "*clean-up*" en una adsorbent de sílica amb cadenes C_{18} (ACCUBOND®). Implementar el mètode desenvolupat en un sistema "*on-line*" SPE-HPLC per a la determinació de cafeïna.

8.- Aplicar la metodologia analítica desenvolupada per determinar cafeïna, com a traçador de contaminació per aigües residuals, en aigües naturals (rieres de la Costa Brava. Comparar les concentracions de cafeïna al llarg del procés de tractament d'aigües residuals en EDARs de característiques diferents.

CAPÍTOL 2

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE 2,4-D, MCPA I ELS SEUS METABÒLITS FENÒLICS

CONTINGUTS CAPÍTOL 2:

2.1. DETERMINACIÓ DE 2,4-D, MCPA I METABÒLITS FENÒLICS.....58

2.1.1. TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES.....58
2.1.1.1. Cromatografia de gasos 58
2.1.1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).....60
2.1.2.ELECTROFORESI CAPIL·LAR.....62

2.2. EXPERIMENTAL.....63

2.2.1. REACTIUS.....63
2.2.2. DISSOLUCIONS.....63
2.2.3. APARELLS I MATERIALS.....64

2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....65

2.3.1. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE IP-HPLC.....65
2.3.1.1. Longitud d'ona de detecció.....65
2.3.1.2. Composició de la fase mòbil.....66
2.3.1.2.1. Reactiu de parell iònic.....66
2.3.1.2.2. Concentració del reactiu formador de parell iònic.....68
2.3.1.2.3. Percentatge d'acetonitril.....69
2.3.1.2.4. pH de la fase mòbil.....70
2.3.1.3. Dissolvent de la mostra.....74

2.4. REFERÈNCIES.....77

Un dels objectius de la química analítica ambiental és el desenvolupament de mètodes analítics per a la determinació de plaguicides i els seus productes de degradació. Un nombre important dels plaguicides polars que s'utilitzen habitualment encara són difícils de determinar a nivell de 0.1 $\mu g \cdot L^{-1}$ que és la concentració màxima permesa en les aigües destinades al consum humà per la Comunitat Europea [1].

Els herbicides fenoxiacídics com l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D) i l'àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA) són extensament utilitzats en el control de plantes i vegetació. La determinació d'aquests herbicides en aigües i sòls és important per controlar el seu impacte i avaluar la contaminació del medi ambient. Es calcula que només a Europa es consumeixen unes 500 tones a l'any [2].

En sòls, el 2,4-D i MCPA són degradats pels microorganismes presents a derivats fenòlics, principalment 2-metilfenol (2-MP), 2-clorofenol (2-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP) i 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) [3]. Per això és necessari el desenvolupament de mètodes d'anàlisi que permetin la determinació de 2,4-D i MCPA conjuntament amb els seus principals metabòlits. Tant els àcids fenoxiacètics com els clorofenols són transportats sovint cap als sistemes aquàtics a través de vies de

contaminació indirectes com arrossegaments, via aigua d'escorrentia de les àrees agrícoles tractades o accidents per vessaments. Degut a la seva toxicitat i a la gran quantitat d'aplicacions, la monitorització conjunta d'aquests plaguicides i els seus metabòlits és molt important.

2.1. DETERMINACIÓ DE 2,4-D, MCPA I METABÒLITS FENÒLICS

Algunes de les propietats químiques que cal tenir en compte a l'hora de realitzar la seva determinació són la seva baixa volatilitat i el seu caràcter hidrofílic. Degut a això, la major part de les anàlisis es duen a terme mitjançant cromatografia líquida (HPLC), tot i que també es poden determinar per cromatografia de gasos (GC) [2].

2.1.1. TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES

La cromatografia de gasos proporciona separacions més eficients, els temps d'anàlisi són més curts i presenta una gran adaptabilitat a un nombrós interval de detectors molt sensibles. No obstant, la cromatografia líquida és la tècnica a escollir per analitzar anàlits polars, no volàtils i/o termolàbils. Cap de les dues metodologies té una prioritat sobre l'altra en l'anàlisi mediambiental de plaguicides, la qual cosa les fa complementàries [2]. Un exemple és el treball de Durand et al. [4] on s'estudia la determinació d'un grup d'herbicides d'aigües d'estuari amb ambdues tècniques.

2.1.1.1. Cromatografia de gasos

La cromatografia de gasos ha estat extensament utilitzada per a la determinació d'herbicides fenoxiacètics i els seus metabòlits fenòlics en aigües i sòls ja que presenta algunes avantatges com l'elevada eficiència de separació, bona resolució dels pics cromatogràfics, bona sensibilitat i velocitat d'anàlisis [5]. La sensibilitat de la tècnica per a aquests compostos millora quan s'utilitzen detectors com el de captura d'electrons (ECD) [6-10] o l'espectròmetre de masses (MS) [11-18]. En la major part dels mètodes descrits en la bibliografia s'aconsegueixen límits de detecció de l'ordre dels $\mu g \cdot L^{-1}$.

La baixa volatilitat i elevada polaritat dels herbicides fenoxiacètics fa necessària la seva derivatització abans de la determinació per GC, el que comporta una etapa

addicional a part d'un augment del temps d'anàlisi. Alguns dels agents derivatitzants que s'han utilitzat són els descrits a la **Taula 2.1**.

Taula 2.1. Reactius derivatitzants aplicats a la determinació de 2,4-D i MCPA per cromatografia de gasos.

Reactiu derivatitzant	Referències
Diazometà	[14,15]
Trifluoroetanol (TFE)	[19]
Anhídrid pentafluoropropiònic i pentafluoropropanol	[16]
Bromur de pentafluorobenzil (PFBBr)	[15,20]
Trimetilsilil i diazometà	[17]
2-cianoetildimetil(dietil)-aminosilà (CEDMSDEA)	[2]
Trifluorur de bor i metanol	[15,18,21]

La utilització de diazometà com a reactiu derivatitzant presenta molts inconvenients ja que és un reactiu tòxic i té propietats explosives. Aquestes característiques fan que requereixi unes precaucions determinades alhora de manipular-ho, per això es sol recórrer a reactius menys tòxics i més eficients [22]. Tot i així, s'han determinat herbicides neutres i acídics en aigües naturals (triazines, acetamides i àcids fenoxiacètics) derivatitzant amb diazometà [22]. El mètode ha estat aplicat a l'anàlisi de tot tipus d'aigües, convertint-se en una eina important per a la determinació de plaguicides a nivells de nanograms per litre.

La derivatització amb trifluorur de bor i metanol s'ha emprat per a diferents àcids fenoxiacètics, tals com 2,4-D, MCPA i àcid 4-cloro-2-metilfenoxipropiònic (MCPP), en sòls i cereals [23]. Els límits de detecció són de 0.005 $\mu g \cdot g^{-1}$ en sòl i 0.04 $\mu g \cdot g^{-1}$ en mostres de plantes. Una alternativa és derivatitzar amb BF_3 i 2-cloroetanol [24], obtenint-se recuperacions dels ésters metílics i 2-cloroetílics de 2,4-D del 91 i 92% respectivament. El mètode és segur, senzill i robust.

Una opció menys dràstica és derivatitzar "*in situ*" utilitzant com a agent derivatitzant bromur de pentafluorobenzil (PFBBr) [25], obtenint derivats de pentafluorobenzil per a plaguicides polars i no polars. Per exemple, s'aconsegueixen

recuperacions d'extractes de sòl fortificat de 54 i 61% per al 2,4-D i l'àcid 2,4,5-triclorofenoxiacètic (2,4,5-T), respectivament.

Hi ha tecnologies que han acoblat "*on-line*" la derivatització amb el sistema cromatogràfic. Ding et al. [26] analitzen grans volums d'aigua contenint 2,4-D, silvex (àcid 2,4,5-triclorofenoxipropiònic) i 2,4,5-T. L'estudi consisteix en l'avaluació de diferents reactius derivatitzants de sals de tetraalquilamoni contingudes en el port d'injecció del cromatògraf de gasos. Els resultats obtinguts mostren que les recuperacions es troben en l'interval de 70 a 99% amb desviacions estàndard relatives entre 1 i 13%.

S'han determinat herbicides en sòl utilitzant com a reactiu esterificant metanol amb H_2SO_4 [27]. Es tracta d'un mètode ràpid i que utilitza reactius menys tòxics que els anteriors que permet determinar els ésters del 2,4-D per CG-FID/MS.

2.1.1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase invertida sol ser la tècnica escollida per separar i analitzar els herbicides acídics i derivats fenòlics ja que és una tècnica idònia per compostos de baixa volatilitat i polaritat elevada i permet l'anàlisi directa sense necessitat d'una etapa prèvia de derivatització [28-34]. Els àcids fenoxiacètics són compostos polars amb pressions de vapor baixes i és més simple fer una determinació per HPLC ja que, com ja hem vist a l'apartat anterior, en GC cal preparar derivats volàtils. Per a la detecció s'han aplicat diverses tècniques, sent la més comuna la detecció UV-Visible a una longitud d'ona fixa [2,35-39] o detecció amb matriu de díodes (DAD) [2,40].

Un procediment ràpid per a la determinació d'herbicides fenoxiacètics en mostres ambientals d'aigua és el recollit per Sancho-Llopis et al. [37] que combina dos procediments "*off-line*" d'extracció en fase sòlida abans de la determinació per cromatografia líquida i detecció a 280 nm. També s'ha determinat 2,4-D mitjançant cromatografia líquida amb columnes acoblades (LC-LC) [37,40], millorant la sensibilitat i la selectivitat amb detecció UV-Visible a 228 nm. Altres anàlisis s'han realitzat mitjançant derivatització post-columna amb detector de fluorescència utilitzant com a agent derivatitzant 9-antril-diazometà (ADAM) [41]. Els herbicides 2,4-D i MCPA s'han determinat per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS) amb preconcentració "*on-line*" mitjançant extracció en fase sòlida [42]. Els

valors baixos de pK_a dels herbicides fenoxiacètics (2.98 i 3.14 per 2,4-D i MCPA respectivament) fan que sigui necessari utilitzar fases mòbils àcides per permetre la seva separació per cromatografia líquida en fase invertida [29-34], però això és problemàtic degut a la inestabilitat de les fases estacionàries de base sílica en condicions àcides [43]. La utilització del mecanisme de parell iònic elimina la necessitat de tenir els herbicides acídics i derivats fenòlics en forma neutra permetent la separació a condicions de pH intermèdies que són més adients a l'estabilitat de les columnes d'HPLC.

La cromatografia líquida de parell iònic (IP-HPLC) ha estat utilitzada en la determinació d'herbicides àcids. Arjmand et al. [44] utilitzen el fosfat de tetrabutilamoni (TBA) per millorar la separació de dicamba i els seus productes de degradació. Balinova [45] utilitza trietilamina (TEA) per separar dicamba, bentazona, benazolin, 2,4-D i MCPA. Geerdnik et al. [46] proposen un mètode per a la determinació d'herbicides fenoxiacètics, tals com 2,4-D, MCPA, MCPP, àcid 2-(2,4-diclorofenoxi)propiònic (2,4-DP) i 2,4,5-T, en aigües com a alternativa a la determinació d'aquests compostos per cromatografia de gasos després de la seva conversió en els corresponents ésters metílics utilitzant metanol-BF_3 com a agent derivatitzant. No obstant, el mètode resulta incòmode, poc reproduïble i amb temps d'anàlisi llargs degut a les successives etapes d'extracció líquid-líquid que es requereixen. Aquest mètode està basat en la concentració dels anàlits mitjançant una precolumna polimèrica i la separació cromatogràfica a 50ºC amb un mètode de parell iònic, utilitzant com a fase mòbil una barreja acetonitril:aigua amb una concentració de TBA de 10 $mmol \cdot L^{-1}$ a pH 11, que també s'utilitza per a la desorció dels anàlits de la precolumna. Els resultats mostren que tan sols es poden aplicar de 10 a 50 mL d'aigua superficial a la precolumna sense observar trencament. Els límits de detecció que obtenen en aigües superficials es troben en l'interval 0.1-0.5 $\mu g \cdot L^{-1}$, mentre que per a aigua potable s'arriba a límits de detecció de 10-50 $ng \cdot L^{-1}$.

El principal inconvenient en la determinació per HPLC és la presència de substàncies húmiques i fúlviques en les aigües naturals i en les mostres de sòls que poden interferir en la detecció, provocant una desviació de la línia base en el inici dels cromatogrames. Aquest problema es pot resoldre utilitzant una etapa de "*clean-up*" amb extracció en fase sòlida (SPE) que pot, a la vegada, actuar com a etapa de concentració [47]. En tots els estudis per HPLC no es contempla la determinació dels herbicides fenoxiacètics 2,4-D i MCPA conjuntament amb els seus metabòlits fenòlics en mostres

d'aigües i sòls, sent necessari desenvolupar un mètode que permeti la separació i determinació ràpida d'aquests compostos en aigües i sòls.

2.1.2. ELECTROFORESI CAPIL·LAR

L'electroforesi capil·lar (CE) també es pot utilitzar per a la determinació d'aquests herbicides [48-51]. S'han realitzat estudis amb mescles d'herbicides derivats de la fenilurea contenint herbicides fenoxiacètics, obtenint-se bons resultats utilitzant tampó fosfat 0.02 M a pH = 7.0 per a mostres de riu fortificades [52]. També s'ha utilitzat aquesta tècnica per a la determinació d'herbicides fenoxiacètics (2,4-D i 2,4,5-T) i dos clorofenols (2,4-DCP i 2,4,5-TCP) [53]. Una altra tècnica electroforètica utilitzada per a la determinació de 2,4-D i Dicamba (àcid 2-metoxi-3,6-diclorobenzoic) en aliments és la cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC) amb detecció UV [54].

Els alts límits de detecció de les tècniques electroforètiques quan s'utilitza detecció UV les fan inapropiades per a la determinació d'aquests compostos a nivells traça. No obstant, l'ús de detectors de masses (MS) acoblats a CE ha esdevingut una tècnica que permet la identificació i quantificació de compostos amb límits de detecció cada vegada més baixos [55,56].

En aquest capítol es descriu el desenvolupament d'un mètode de cromatografia líquida per a la determinació conjunta de 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics, i l'aplicació del mètode a l'anàlisi de mostres de sòls.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1 REACTIUS

- Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D): sòlid, 98.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA): sòlid, 97.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-metilfenol (2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-clorofenol (2-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-clorofenol (4-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2,4- diclorofenol (2,4-DCP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid sulfúric (H_2SO_4): líquid, 96 %, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Àcid o-fosfòric (H_3PO_4): líquid, 85 %, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Hidròxid sòdic (NaOH): sòlid, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Metanol (CH_3OH): líquid, , RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Hidròxid de tetrabutilamoni (TBA-OH): líquid, Fluka, Buchs, Suïssa.
- Trietilamina (TEA): líquid, Fluka, Buchs, Suïssa.
- Sulfat de tetrabutilamoni: líquid, Waters, Milford, MA, USA.

2.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolucions estoc de 2,4-D, MCPA, 2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP, 2,4-DCP (c.a. 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$): es pesa el sòlid i s'arrasa amb metanol.
- Dissolucions de treball per dilució dels estocs en metanol, aigua o metanol:aigua (1:1) segons convingui.

Totes les solucions es conserven refrigerades a 4ºC. En aquestes condicions, les solucions estoc es poden conservar fins a un mes, mentre que les solucions de treball no més d'una setmana.

Les mostres de sòl són agafades de tres horitzons diferents (A: 0-30 cm; B: 30-60 cm; C: 60-120 cm) en el camp de golf "*Serres de Pals*" (Girona, Espanya). Es tracta d'un sòl alcalí, composat principalment de calcita i quars i un petit contingut d'argila. El pH del sòl varia de 7.6 a 8.2 (1:1 en aigua) depenent de la profunditat. La composició del sòl també varia amb la profunditat: 4-6% argila, 34-38% fang, 52-54% sorra. Les mostres de sòl s'assequen al laboratori a temperatura ambient, es passen per un tamís de 2 mm i es guarden en ampolles àmbar a -20ºC, sense que s'hagi observat alteració deguda a l'activitat microbiana en aquestes condicions. Una explicació més detallada de les característiques del sòl, així com del procés de presa de mostra, es proporciona en el **Capítol 5**, dedicat a l'estudi de camp.

2.2.3. APARELLS I MATERIALS

- Cromatògraf líquid Shimadzu (Kyoto, Japó) que incorpora un injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) amb bucle de 20 µL, 2 bombes LC-9A, detector UV-Visible SPD-6AV, registrador Chromatopac C-R6A, columna cromatogràfica de 20 cm x 0.46 cm i.d. empaquetada amb fase sílica Kromasil 100 C18 ODS (Teknokroma, Barcelona, Espanya). Per protegir la columna analítica es va emprar una precolumna ODS (TR-C-160-1, Teknokroma, Barcelona, Espanya). El flux de la fase mòbil és de 1 $mL \cdot min^{-1}$ i les anàlisis es realitzen a 25±1ºC.
- Xeringa per a HPLC de 100 µL (Hamilton, Bonaduz, Suïssa).
- Bomba peristàltica Minipuls 3 M312 (Gilson, Villiers Le Bel, França).
- Bany d'ultrasons (P. Selecta, Abrera, Espanya).
- Agitador rotatori (Dinko, Barcelona, Espanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de 0.45 µm mida de porus (Whatman, Maidstone, UK).
- pHmetre GLP22 (Crison, Barcelona, Espanya).
- Balança analítica electrònica A200S amb precisió de ± 0.1 mg (Sartorius Analytic, Göttingen, Alemanya).
- Sistema d'aigua ultrapura Milli-Q (Millipore Ibérica, Barcelona, Espanya).

2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.3.1. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE IP-HPLC

Com ja s'ha comentat, l'objectiu d'aquest capítol és desenvolupar un mètode de cromatografia líquida per parell iònic i estudiar els diferents paràmetres que afecten a la determinació conjunta de 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics per tal d'aplicar el mètode a l'anàlisi de mostres de sòls provinents del camp de golf "*Serres de Pals*".

2.3.1.1. Longitud d'ona de detecció

Per tal de determinar la longitud d'ona de mesura es fa un escombrat de longituds d'ona per veure en quina zona de l'espectre UV presenten màxims d'absorció els 5 compostos avaluats. No es tenen en compte longituds d'ona inferiors a 210 nm ja que en aquesta zona les interferències dels dissolvents utilitzats a les fases mòbils són importants. A la **Figura 2.1**. es mostra l'espectre dels 5 compostos en el rang de 210 a 310 nm. Es pot observar que hi ha dos màxims d'absorció a uns 230 i 280 nm aproximadament, sent superior el primer per a tots 5 compostos. Es decideix fer totes les mesures fixant 230 nm com a longitud d'ona de treball.

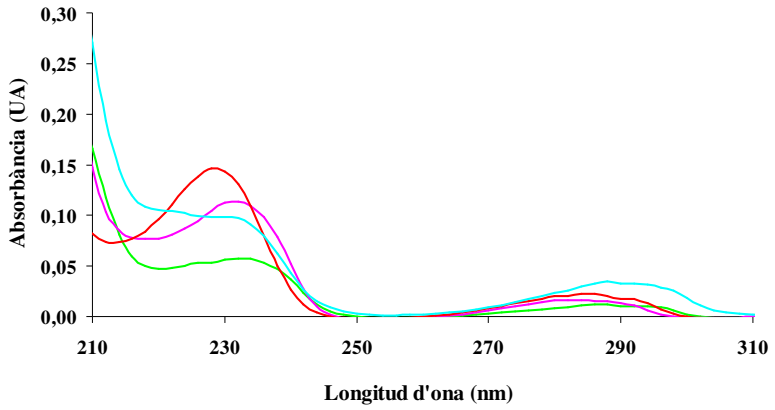


Figura 2.1. Espectres d'absorció dels herbicides i metabòlits fenòlics en aigua.
Condicions experimentals: solucions amb 1 $mg \cdot L^{-1}$ de cadascun dels compostos en aigua. Línia blava: 2,4-DCP, línia verda: 2,4-D, línia rosa: MCPA i línia vermella: 4-CP.

2.3.1.2. Composició de la fase mòbil

2.3.1.2.1. Reactiu de parell iònic

El reactiu de parell iònic emprat és un dels paràmetres més importants que afecten la retenció i selectivitat en cromatografia líquida amb parell iònic [54]. En estudis previs s'ha treballat amb diferents reactius de parell iònic per a la separació de 2,4-D i MCPA [44-46]. Balinova [45] troba que els reactius amb llargues cadenes alquíliques, com el tetrabutilamoni (TBA), proporcionen un augment considerable dels temps d'elució per al 2,4-D i MCPA, mentre que cadenes alquíliques més curtes, com la trietilamina (TEA), mostren millors resultats en la separació d'herbicides acídics, amb temps de retenció més apropiats. Els resultats obtinguts en aquest estudi (**Taula 2.2**) mostren el mateix comportament per als herbicides 2,4-D i MCPA. Tal i com es pot observar, els temps de retenció obtinguts amb la utilització de TEA per als herbicides fenoxiacètics són inferiors (valors inferiors del factor de capacitat) que amb TBA. Els metabòlits fenòlics, en canvi, són retinguts més fortament per la columna amb TEA i els temps d'anàlisi que es requereixen per determinar tots els compostos d'interès es fa massa elevat (la **Taula 2.2** mostra els factors de capacitat obtinguts per a 2,4-DCP, el compost més retingut per la columna cromatogràfica, com a representatiu). Com a conseqüència, per a la determinació de tots els anàlits conjuntament es requereix un temps d'anàlisi massa llarg utilitzant TEA com a reactiu de parell iònic. A més, utilitzant TEA la resolució per al parell 2,4-D, MCPA és petita i no s'obté separació a la línia base. Amb la utilització de TBA-OH com a parell iònic s'obtenen temps de retenció més elevats per als herbicides acídics, però els derivats fenòlics queden menys retinguts per la columna cromatogràfica i els resultat conjunt és que el temps d'anàlisi per a tots els anàlits és inferior, obtenint-se resolucions adequades per a tots els parells de compostos.

Taula 2.2. Dependència del factor de capacitat (*k*) dels herbicides fenoxiacètics i 2,4-diclorofenol amb el reactiu de parell iònic utilitzat (R_S és la resolució obtinguda en la separació del parell MCPA i 2,4-D).

Condicions experimentals: fase mòbil d'acetonitril:aigua (30:70) amb 10 mM de reactiu de parell iònic a pH=7.2.

	Reactiu de parell iònic		
	TEA	**TBA (OH^-)**	**TBA (HSO_4^-)**
MCPA	1.8	6.0	17.6
2,4-D	1.9 (R_s=1.1)	6.8 (R_s=2.5)	18.9 (R_s=1.8)
2,4-DCP	35.2	10.1	>30

El contraió present en el reactiu de parell iònic té una influència important en l'eficiència de separació del mètode IP-HPLC (**Taula 2.2**). La utilització d'hidrogen sulfat com a contraió quan TBA és el reactiu de parell iònic comporta un augment en el factor de capacitat per a tots els anàlits. Els temps d'anàlisi més curts s'obtenen amb la utilització d'hidroxil com a contraió, sense que això afecti significativament a la resolució cromatogràfica. Així, s'ha escollit l'hidroxil com a contraió en els experiments subsegüents.

2.3.1.2.2. Concentració del reactiu formador de parell iònic

L'increment de la concentració de TBA-OH en el interval 5 mM a 10 mM dóna lloc a una disminució en els factors de capacitat (*k*) per a tots els anàlits, obtenint-se una resolució adient per a tots els parells d'anàlits a totes les concentracions avaluades amb una fase mòbil contenint un 30 % d'acetonitril. S'ha seleccionat una concentració de 10 mM ja que concentracions superiors comporten un increment excessiu en la pressió del sistema sense que es millori significativament la separació del parell crític 2,4-D i MCPA. Els valors obtinguts per als diferents paràmetres cromatogràfics es recullen a la **Taula 2.3.**

Taula 2.3. Dependència dels factors de capacitat (*k*) dels dos herbicides fenoxiacètics (2,4-D i MCPA) i 2,4-diclorofenol amb la concentració de TBA-OH a la fase mòbil. (R_S és la resolució obtinguda en la separació del parell MCPA i 2,4-D)
Condicions experimentals: fase mòbil d'acetonitril-aigua (30:70, v/v) a pH=7.2 .

	Concentració TBA-OH		
	5 mM	**7.5 mM**	**10 mM**
MCPA	11.1	6.7	6.0
2,4-D	12.5 (R_s=2.7)	7.6 (R_s=2.8)	6.8 (R_s=2.5)
2,4-DCP	31.4	22.4	10.1

2.3.1.2.3. Percentatge d'acetonitril

La diferent tipologia dels modificadors orgànics afegits a la fase mòbil afecten considerablement la separació, per tant, cal considerar-lo un paràmetre important en l'estudi de les condicions de separació més adequades. S'han avaluat modificadors orgànics de diferent naturalesa, els quals els podem ordenar de la següent manera segons la sèrie eluotròpica:

Metanol < Acetonitril < Tetrahidrofurà (THF)

L'ús de THF s'ha descartat ja que no s'aconsegueix una bona separació dels pics ni una bona estabilització del sistema. El metanol també es descarta ja que el 2,4-diclorofenol presenta temps de retenció massa elevats. El modificador orgànic escollit ha estat l'acetonitril que presenta característiques intermèdies.

La proporció d'acetonitril present a la fase mòbil afecta la retenció dels diferents compostos ja que modifica la lipofilicitat de la fase mòbil. Segons es mostra a la **Figura 2.2**, percentatges inferiors al 30% d'acetonitril donen lloc a una bona separació dels anàlits però comporten valors elevats dels factors de capacitat (*k* entre 6 i 21 amb un 25 % d'acetonitril). Quan el contingut d'acetonitril és superior al 30%, la resolució del parell més crític (2,4-D i MCPA) disminueix i no s'obté una bona separació. Els millors resultats cromatogràfics s'obtenen amb una fase mòbil amb 30% d'acetonitril. Aquesta

fase mòbil proporciona els temps d'anàlisi més baixos amb separació a la línia base de tots els anàlits.

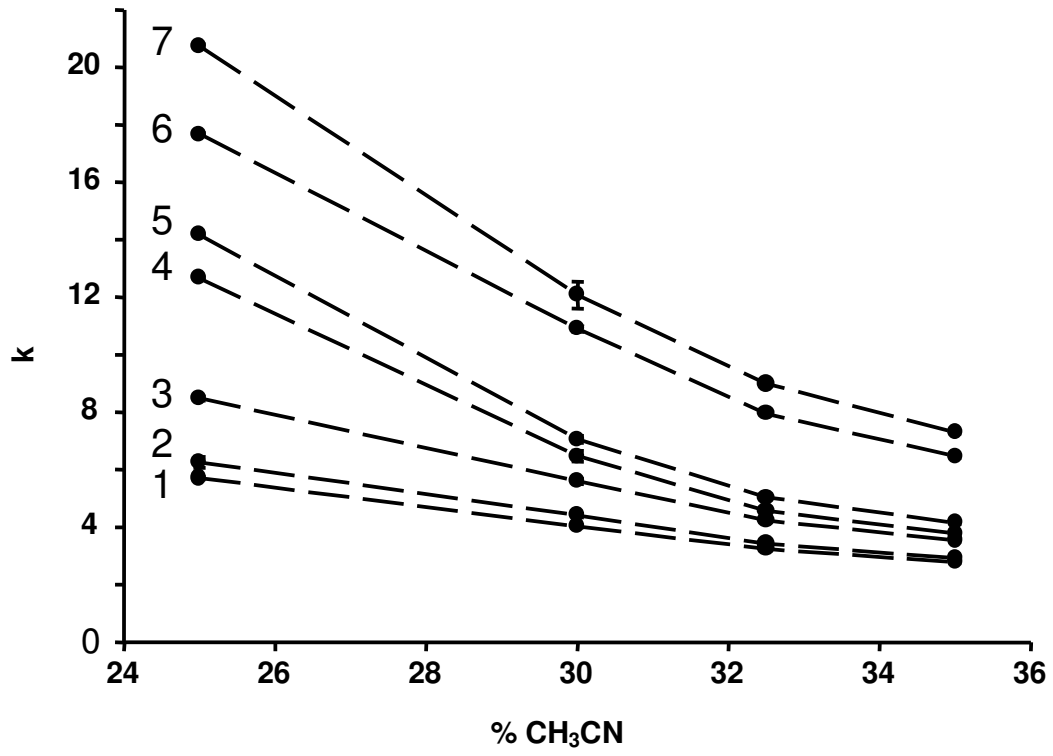


Figura 2.2. Efecte del percentatge d'acetonitril en la fase mòbil en el valor del factor de capacitat (*k*) per als diferents anàlits avaluats (**1**: 2-MP, **2**: 2-CP, **3**: 4-CP, **4**: MCPA, **5**: 2,4-D, **6**: 4-C-2-MP, **7**: 2,4-DCP). La fase mòbil conté 10 mM TBA-OH, pH=7.2

2.3.1.2.4. pH de la fase mòbil

El pH de la fase mòbil és el paràmetre més crític en la separació dels herbicides fenoxiacètics ja que una petita variació del pH pot provocar grans canvis en els temps de retenció (**Figura 2.3**), la resolució i l'eficàcia.

La cromatografia líquida de parell iònic és una tècnica idònia per a la separació d'anàlits neutres i ionitzats utilitzant columnes de fase invertida, permetent la separació sota condicions de pH que ajuden a prevenir la degradació de la fase de sílica i allargar el temps de vida de la columna. A la **Figura 2.3** es mostra com afecta la variació del pH de la fase mòbil en l'eficiència de separació del mètode proposat. Els metabòlits

fenòlics estudiats estan protonats a valors de pH ≤ 8 (veure valors de pK_a a la **Taula 2.4**) i per tant no seran retinguts pel mecanisme de parell iònic. Així, s'obtenen temps de retenció pràcticament constants per a tots els derivats fenòlics quan el pH de la fase mòbil s'incrementa fins a pH=8.2. Només el 2,4-diclorofenol (pic #7) mostra una lleugera davallada en el temps de retenció quan el pH s'incrementa de 7.2 a 8.2 ja que aquest compost està ionitzat en un 50% a pH=8 (pK_a=8.05). Els anàlits més acídics (2,4-D i MCPA), que estan ionitzats en tot el interval estudiat i han de formar el parell iònic per ser retinguts per la columna, mostren una davallada important en el temps de retenció quan el pH de la fase mòbil s'incrementa fins a 8.2. L'augment del pH de la fase mòbil fins a 13 dóna lloc a la ionització de tots els anàlits i té com a conseqüència una disminució en el temps de retenció per a tots els derivats fenòlics. Els herbicides fenoxiacètics no mostren diferències significatives en els seus temps de retenció a pH alcalins de la fase mòbil.

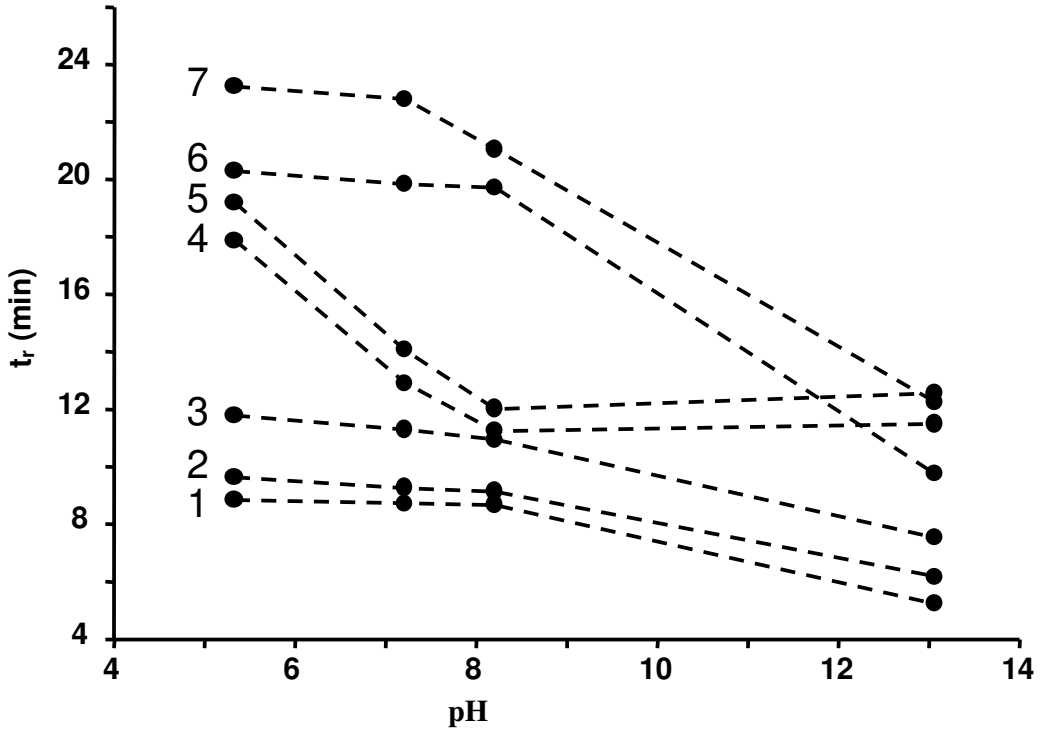


Figura 2.3. Efecte del pH de la fase mòbil en el temps de retenció dels anàlits estudiats (**1**: 2-MP, **2**: 2-CP, **3**: 4-CP, **4**: MCPA, **5**: 2,4-D, **6**: 4-C-2-MP, **7**: 2,4-DCP) . La fase mòbil conté 30% d'acetonitril i 10 mM TBA-OH.

Taula 2.4. Valors de pK_a i coeficients de partició octanol-aigua (log P_{ow}) dels anàlits estudiats.

Pic #	Anàlit	pK_a	log P_{ow}
1	2-metilfenol	10.31 ± 0.02	1.94 ± 0.19
2	2-clorofenol	8.5 ± 0.02	2.04 ± 0.21
3	4-clorofenol	9.1 ± 0.02	2.4 ± 0.22
4	MCPA	3.14 ± 0.02	2.49 ± 0.26
5	2,4-D	2.98 ± 0.02	2.60 ± 0.28
6	4-cloro-2-metilfenol	9.86 ± 0.02	2.89 ± 0.22
7	2,4-diclorofenol	8.05 ± 0.02	2.99 ± 0.24

L'augment en la concentració de TBA de la fase mòbil provoca un increment en els temps de retenció en IP-HPLC [54]. Els resultats obtinguts confirmen aquest efecte i indiquen que és més significatiu per als dos compostos principals (2,4-D i MCPA). Per a concentracions superiors a 10 mM no s'obté una bona separació cromatogràfica per als dos herbicides fenoxiacètics. Els millors resultats s'obtenen a concentració baixa, ajustant el pH de la fase mòbil amb àcid fosfòric concentrat fins a pH = 7.2. La utilització d'altres àcids, com l'àcid perclòric i l'àcid clorhídric, donen temps de retenció i resolucions equivalents a les obtingudes amb àcid fosfòric, però la reproduïbilitat en els temps de retenció per a 2,4-D i MCPA no és bona degut a les variacions temporals del pH de la fase mòbil en no estar tamponada amb l'ús d'aquests altres àcids. Es important destacar que el temps de retenció dels dos herbicides fenoxiacètics és altament depenent del pH de la fase mòbil a valors de pH al voltant de 7 (**Figura 2.3**), per això el pH de la fase mòbil s'ajusta amb àcid fosfòric com a solució tamponant i així queda estable i permet obtenir temps de retenció reproduïbles per a tots els anàlits.

El factor limitant per a la completa determinació de tots els compostos avaluats en aquest estudi és la separació del parell 2,4-D i MCPA ja que els temps de retenció d'aquests dos anàlits estant estretament lligats a les condicions cromatogràfiques. En la **Figura 2.4a** es mostra el cromatograma d'una barreja sintètica aquosa amb tots els anàlits d'interès analitzada amb el mètode de IP-HPLC desenvolupat.

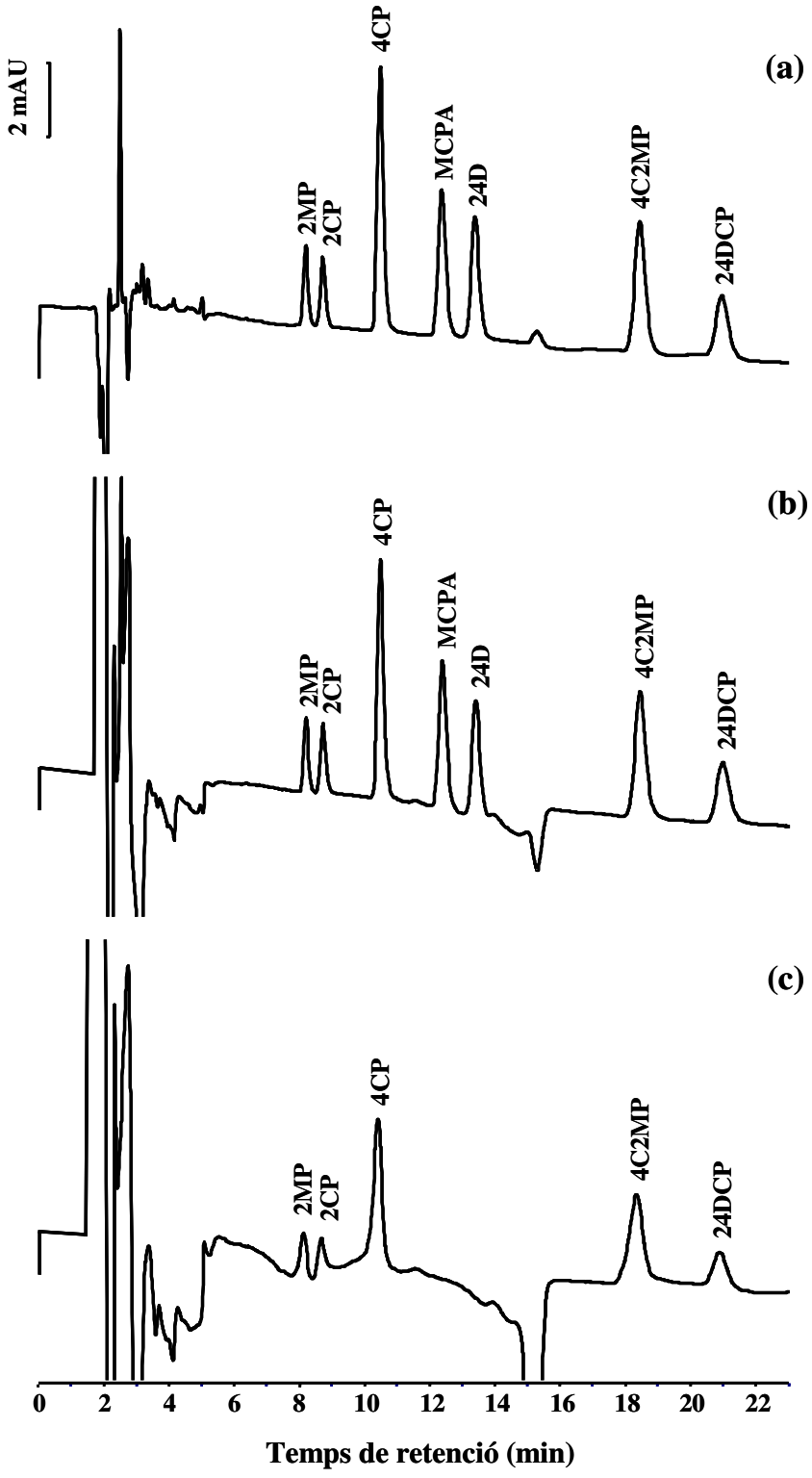


Figura 2.4. Cromatogrames obtinguts per la injecció de dissolucions que contenen els anàlits a 1.0 mg·L^{-1}. (a) Dissolució preparada en aigua, (b) dissolució preparada en metanol:aigua (1:1), (c) dissolució preparada en metanol. La fase mòbil conté 10 mM TBA-OH i 30% d'acetonitril, pH = 7.2, injecció de 20 µL de patró en tots els casos.

2.3.1.3. Dissolvent de la mostra

Un dels objectius d'aquest estudi és la utilització del mètode IP-HPLC desenvolupat per a l'anàlisi dels herbicides 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics (2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) en mostres de sòls. La baixa concentració d'aquests anàlits en mostres ambientals fa impossible la determinació directa en extractes de sòls i es fa necessària una etapa prèvia de concentració per obtenir mostres que es puguin analitzar pel mètode IP-HPLC. Una de les tècniques més habituals per extreure i concentrar anàlits presents en mostres ambientals és l'extracció en fase sòlida (SPE). Si es fa servir aquesta metodologia per eluir els anàlits retinguts per l'adsorbent de SPE són necessaris dissolvents orgànics o barreges orgànic-aquoses. Per això, s'estudia l'efecte de la lipofilicitat del dissolvent de la mostra en la separació cromatogràfica dels anàlits d'interès. No s'ha observat cap diferència en els factors de capacitat i resolucions per als metabòlits fenòlics quan les mostres estan preparades en aigua, metanol o acetonitril. Els resultats obtinguts, en canvi, mostren que l'augment en el caràcter lipofílic del dissolvent dóna lloc a un increment de l'amplada de pic per als dos herbicides fenoxiacètics, principalment per al 2,4-D, sense modificar els temps de retenció. A la **Taula 2.5** es mostra la disminució en la resolució del parell d'herbicides quan augmenta el caràcter hidrofòbic del dissolvent de la mostra. Es produeix un increment en l'amplada de pic per al 2,4-D quan el percentatge de metanol en la dissolució augmenta. Percentatges de metanol iguals o superiors al 70% resulten insatisfactoris, amb l'aparició de pics molt amples que fa impossible la separació del 2,4-D i MCPA en una anàlisi quantitativa en mescles dels anàlits.

Taula 2.5. Valors de mitja alçada de pic ($w_{1/2}$) i resolució (R_S) obtinguts en la separació d'una barreja que conté 2,4-D i MCPA utilitzant metanol:aigua amb diferents percentatges com a dissolvent de la mostra.

Condicions experimentals: fase mòbil acetonitril:aigua (30:70) amb 10 mM TBA-OH i pH=7.2

MeOH:aigua	MCPA	2,4-D	R_S
	$w_{1/2}$ (s)	$w_{1/2}$ (s)	
0:100	10.9	12.2	2.0
50:50	11.4	13.9	1.8
55:45	11.4	15.2	1.7
60:40	11.8	23.3	1.4
70:30	12.6	> 40	0

En la **Figura 2.4** es mostren els cromatogrames corresponents a barreges sintètiques dels anàlits en metanol:aigua, 50:50 (**Figura 2.4.b**) i en metanol 100% (**Figura 2.4.c**). El 2,4-D i MCPA no han estat addicionats en barreges preparades en metanol 100% ja que no es poden separar en aquestes condicions cromatogràfiques.

Linealitat i límit de detecció del mètode IP-HPLC

Els resultats obtinguts indiquen que no hi ha variació en la sensibilitat (determinada com el valor del pendent de la recta de calibratge) del mètode proposat pels anàlits quan les mostres estan dissoltes en aigua o metanol:aigua (50:50). La **Taula 2.6** mostra els valors obtinguts en l'avaluació dels paràmetres de linealitat i els límits de detecció del mètode proposat quan les mostres estan dissoltes en metanol:aigua (50:50). Per a determinar els límits de detecció (**Taula 2.6**) s'injecten patrons en ordre decreixent de concentració fins que la relació senyal-soroll obtinguda experimentalment són lleugerament superiors entre 3 i 1. Els resultats obtinguts amb metanol pur mostren que la sensibilitat baixa a la meitat (i.e. els pendents obtinguts per les mostres en metanol són aproximadament un 50% dels valors obtinguts per les mostres dissoltes en aigua o en metanol:aigua, 50:50). Per altra banda, els límits de detecció per als

metabòlits fenòlics dissolts en metanol són dues vegades superiors als valors obtinguts en la barreja metanol:aigua.

Taula 2.6. Paràmetres de calibratge (pendent (b), ordenada a l'origen (a), coeficient de regressió i límits de detecció) determinats per set anàlits dissolts en aigua:metanol (50:50). Els valors entre parèntesis corresponen a la desviació estàndard dels valors calculats. Cada calibratge ha estat obtingut amb un mínim de 5 punts experimentals en l'interval 0.05 $mg \cdot L^{-1}$ – 50 $mg \cdot L^{-1}$. La linealitat del calibratge ha estat confirmada mitjançant l'avaluació dels residuals.

Anàlit	a ($\cdot 10^3$)	b ($\cdot 10^3$)	R^2	LD ($\mu g \cdot L^{-1}$)
2-MP	2.2 (0.6)	73.4 (0.5)	0.9998	25
2-CP	0.1 (1.4)	102.7 (1.2)	0.9996	50
4-CP	2.8 (4.7)	340.8 (4.1)	0.9997	25
MCPA	5.6 (2.3)	239.2 (0.2)	0.9998	1
2,4-D	-4.2 (9.1)	254.8 (8.4)	0.9968	25
4-C-2-MP	5.7 (5.8)	266.6 (5.3)	0.9988	25
2,4-DCP	1.3 (2.6)	222.1 (2.2)	0.9997	25

Així, el mètode adient per a l'anàlisi conjunta de 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics serà utilitzar un mètode IP-HPLC amb una fase mòbil de composició acetonitril:aigua (30:70), 10 mM de TBA-OH a pH = 7.2 i fixant com a longitud de treball 230 nm.

2.4. REFERÈNCIES

1. RD 140/2003, BOE nº 45, 21 febrer 2003.
2. S. Hatrík, J. Tekel, J. Chromatogr. A, 733 (1996), 217.
3. L. Fava, M.A. Orrù, A. Crobe, A. Barra Caracciolo, P. Bottoni, E. Funari, Microchemical J., 79 (2005), 207.
4. G. Durand, V. Bouvot, D. Barceló, J. Chromatogr. 607 (1992), 319.
5. Environmental Analysis, W. Kleiböhmer, "Handbook of Analytical Separations", volume 3, Elsevier, Münster (Alemania), 2001, ISBN: 0-444-50021-9.
6. F. Ngan, T.I. Kesaki, J. Chromatogr. A, 537 (1991), 385.
7. K.W. Edgell, E.J. Erb, R.J. Wesselman, J.E. Longbottom, J. AOAC Int., 76 (1993), 1098.
8. M.C. Wei, J.F. Fen, J. Chromatogr. A, 1012 (2003), 111.
9. F. Sicbaldi, A. Sarra, D. Mutti, P.F. Bo, J. Chromatogr. A, 765 (1997), 13.
10. D.A. Rimmer, P.D. Johnson, R.H. Brown, J. Chromatogr. A, 755 (1996), 245.
11. P.D. Johnson, D.A. Rimmer, R.H. Brown, J. Chromatogr. A, 765 (1997), 3.
12. N. Li, H.K. Lee, Anal. Chem., 72 (2000), 3077.
13. L. Ramos, L.E. Sojo, J.J. Vreuls, V.A.T. Brinkman, Environ. Sci. Technol., 34 (2000), 1049.
14. T. Suzuki, H. Kondo, K. Yaguchi, T. Maki, T. Suga, Environ. Sci. Technol., 32 (1998), 920.
15. T.S. Reighard, S.V. Olesik, Anal. Chem., 69 (1997), 566.
16. L.R. Zimmerman, E.M. Thurman, Abstracts of papers of the American Society, 209 (1995) 13-ENVR.
17. C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, Quím. Anal., 15 (1996), 53.
18. A.L.S. Pena, M.I.N. Silveira, J. Chromatogr. A, 758 (1997), 324.
19. M. Vink, J.M. van der Poll, J. Chromatogr. A, 733 (1996), 361.
20. J.S. Fritz, "Analytical Solid-Phase Extraction", Wiley-VCH, New York, NY (USA), 1999, ISBN: 0-471-24667-0.
21. I. Liska, J. Slobodník, J. Chromatogr. A., 733 (1996), 235.
22. T.D. Buchelli, F.C. Grüebler, S.R. Müller, R.P. Schwarzenbach, Anal. Chem., 69 (1997), 1569.
23. C. Sánchez-Brunete, A.I. García-Valcárcel, J.T. Tadeo, J. Chromatogr. A, 675 (1994), 213.
24. K.C. Ting, P.K. Kho, J. AOAC Int., 81 (1) (1998), 93.
25. M.D. David, S. Campbell, Q.X. Li, Anal. Chem., 72 (2000), 3665.
26. W.H. Ding, C-H. Liu, S-P. Yeh, J. Chromatogr. A, 896 (2000), 111.
27. M.J. Santos Delgado, E. Crespo-Corral, L.M. Polo-Díez, Talanta, 53 (2000), 367.
28. F. Bruner, A. Bertoni, P.Palma, Chromatographia, 43 (1996), 279.
29. A.L.E. Vera, P.C. Padilla, M.G. Hernández, J.L. Meraz, J. Chromatogr. A, 731 (1996), 109.
30. R. Wintersteiger, B. Goger, H. Krautgartner, J. Chromatogr. A, 846 (1999), 349.
31. E.A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbrugge, J. Chromatogr. A, 938 (2001), 23.
32. 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.

33. N. Rosales-Conrado, M.E. Leon-Gonzalez, L.V. Perez-Arribas, L.M. Polo-Diez, Anal. Chim. Acta, 470 (2002), 147.
34. O.P. de Amarante, N.M. Brito, T.C.R. dos Santos, G.S. Nunes, M.L. Bibeiro, Talanta, 60 (2003), 115.
35. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, 793 (1998), 257.
36. M.A. Hernández-Mateos, L.V. Pérez-Arribas, F. Navarro-Villoslada, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, J. Liq. Chromatogr. R. T., 22 (5) (1999), 695.
37. J.V. Sancho-Llopis, F. Hernández-Hernández, E.A. Hogendoorn, P.V. Zoonen, Anal. Chim. Acta, 283 (1993), 287.
38. A. di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi, Anal. Chem., 61 (13) (1989), 1363.
39. V. Gökmen, J. Acar, J. Liq. Chromatogr. R. T., 19 (12) (1996), 1917.
40. A. Balinova, J. Chromatogr. A, 643 (1993), 203.
41. L.M. Dickow, D.F. Gerken, R.A. Sams, S.M. Ashcraft, J. Anal. Toxicol., 25 (1) (2001), 9.
42. S. Chiron, S. Papilloud, W. Haerdi, D. Barceló, Anal. Chem., 67 (1995), 1637.
43. S. Chiron, E. Martinez, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 665 (1994), 283.
44. M. Arjmand, T.D. Spittler, R.O. Mumma, J. Agric. Food Chem., 36 (1988), 492.
45. A. Balinova, J. Chromatogr. A, 728 (1996), 319.
46. R.B. Geerdink, C.A.A. Van Balkom, H.J. Brouwer, J. Chromatogr., 481 (1989), 275.
47. Y-Z. Hsieh, H-Y. Huang, J. Chromatogr. A, 745 (1996), 217.
48. D.H. Craston, M. Saeed, J. Chromatogr. A, 827 (1998), 1.
49. A. Farran, C. Serra, M.J. Sepaniak, J. Chronatogr. A, 835 (1999), 209.
50. F. Menzinger, P. Schmitt-Kopplin, D. Freitag, A. Kettup, J. Chromatogr. A, 891 (2000), 45.
51. A. Farran, O. Hernández, Quím. Analítica, 12 (1993), 205.
52. M. Aguilar, A. Farran, V. Martí, Sci. Total Environ., 132 (1993), 133.
53. F.M. Lanças, S.R. Rissato, M.S. Galhiane, Chromatographia, 50 (1-2) (1999), 35.
54. C.F. Poole, "The Essence of Chromatography", Elsevier, Amsterdam (Holanda), 2003, ISBN: 0-444-50199-1.
55. L. Goodwin, J.R. Startin, B.J. Keely, D.M. Goodall, J. Chromatogr. A, 1004 (2003), 107.
56. S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S-i. Wakida, J. Chromatogr. A, 1051 (2004), 297.

CAPÍTOL 3

AVALUACIÓ DE DIFERENTS SORBENTS PER A L'ENRIQUIMENT DE 2,4-D, MCPA I ELS SEUS METABÒLITS FENÒLICS EN MOSTRES DE SÒL

CONTINGUTS CAPÍTOL 3:

3.1. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA.....81

3.1.1. ADSORBENTS EN SPE.....87
3.1.1.1. Adsorbents de sílica de fase lligada.....88
3.1.1.2. Sòlids adsorbents de carbó.....89
3.1.1.3. Resines de matriu polimèrica.....89
3.1.2. FORMATS SPE DISPONIBLES COMERCIALMENT.....91
3.1.3. ACOBLAMENT "*ON-LINE*" DE SPE A LES TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES.....91
3.1.4. PROBLEMÀTICA EN LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS POLARS.....93

3.2. EXPERIMENTAL.....96

3.2.1. REACTIUS.....96
3.2.2. DISSOLUCIONS.....96
3.2.3. APARELLS I MATERIALS.....97
3.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL.....98
3.2.4.1. Presa de mostra de sòls.....98
3.2.4.2. Extracció de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics.....98

3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....100

3.3.1 DESENVOLUPAMENT DE L'EXTRACCIÓ ALCALINA.....100
3.3.2. SELECCIÓ DE L'ADSORBENT PER A SPE.....103
3.3.3. INFLUÈNCIA DE LA VELOCITAT DE FLUX DE LA MOSTRA.....108
3.3.4. ESTUDI DE LES VARIABLES D'ELUCIÓ.....109
3.3.4.1. Dissolvents de desorció.....109
3.3.4.2. Determinació del volum d'elució.....111
3.3.5. VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC DESENVOLUPAT.....114
3.3.6. ANÀLISI DE MOSTRES REALS.....115

3.4. REFERÈNCIES.....117

3.1. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

L'extracció en fase sòlida (SPE) permet la concentració i purificació dels anàlits presents en una solució mitjançant la seva adsorció en un suport sòlid adient, disposat dins un cartutx o en format disc, i posterior elució amb la mínima quantitat d'un dissolvent apropiat per a l'anàlisi instrumental [1]. Es va desenvolupar per analogia als processos cromatogràfics i s'ha convertit en el mètode de preparació de mostres més utilitzat a l'actualitat ja que permet: a) purificar la mostra, retenint els compostos d'interès i deixant passar les interferències, o bé retenint les interferències mentre el compost d'interès passa lliurement, b) concentrar l'anàlit quan es troba a nivells de concentració baixos a la mostra, c) fraccionar la mostra aplicant un gradient de

dissolvents amb una força d'elució cada cop més gran per eluir i aillar els anàlits a partir de diferències de polaritat, d) canviar el dissolvent de la mostra adsorbint l'anàlit i, posteriorment, eluint-lo amb un altre dissolvent diferent.

El procediment bàsic en SPE consisteix en passar una mostra líquida a través de la columna i els anàlits són retinguts en el material adsorbent [1]. Les interferències es poden eliminar de la columna amb una bona elecció de dissolvents de rentat. Finalment, els anàlits d'interès es recuperen selectivament amb un bon eluent, donant lloc a un extracte altament purificat. El volum d'aquest extracte sol ser més petit que la mostra original, permetent així la concentració dels anàlits.

Els inicis de la SPE es remunten a finals de la dècada dels 70 [2]. Els primers cartutxos comercials disponibles daten de 1978, introduïts per Waters, i el 1979 apareixen les primeres fases adsorbents en format xeringa de la casa Analytichem (actual Varian) [3]. 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 (LLE), però ja a principis dels anys 80, 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 la tècnica de purificació i concentració més emprada. Les fases sòlides generalment emprades són materials adsorbents de sílica modificada o resines polimèriques amb les característiques físiques i propietats químiques adequades. La naturalesa d'aquests materials i els grups funcionals addicionals determinaran el mode d'utilització dels adsorbents.

L'extracció pot tenir lloc en discontinu, on el sòlid extractant està íntimament mesclat amb la solució de la mostra, o en continu, on el sòlid s'empaqueta en un tub o columna i es passa la mostra líquida a través seu, essent aquesta darrera opció la més utilitzada en anàlisi química. L'extracció en fase sòlida no està limitada a l'ús de partícules sòlides per extreure soluts d'una mostra líquida. També es poden passar mostres d'aire o d'altres gasos a través del tub empaquetat per extreure vapors orgànics o altres substàncies presents a la mostra.

La necessitat de concentració de traces, purificació de mostres o l'extracció simultània d'anàlits amb propietats diferents, així com la naturalesa de la matriu, les característiques dels anàlits i les interferències, s'han de tenir en compte en l'elecció final del mètode de treball. L'aplicació més comuna és la purificació i preconcentració simultània de la mostra.

Existeixen diferents configuracions possibles dels sorbents d'extracció en fase sòlida: columnes de vidre amb empaquetament manual del sòlid adsorbent, cartutxos comercials i discs [1] (**Figura 3.1**). El pas de mostra pot ser mitjançant l'aplicació de buit, per gravetat, per centrifugació o mitjançant pressió positiva.

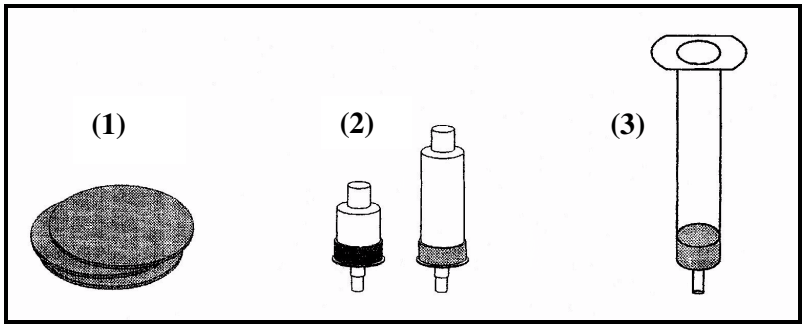


Figura 3.1. Configuracions habituals de SPE: (1) discs, (2) cartutxos i (3) columnes empaquetades.

El procés d'extracció en fase sòlida en qualsevol configuració es pot dividir en quatre etapes [4]: (1) condicionament, (2) adsorció dels anàlits, (3) rentat, i (4) elució dels anàlits. Aquests passos es mostren en la **Figura 3.2.**

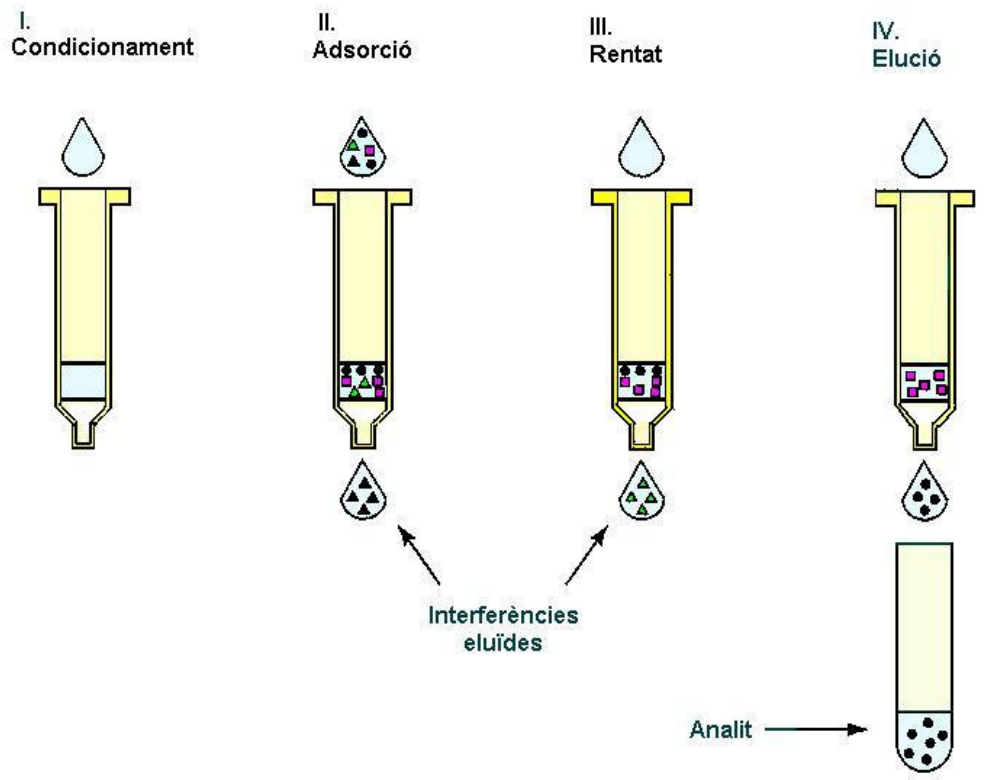


Figura 3.2. Esquema de les quatre etapes en SPE: (I) condicionament, (II) adsorció, (III) rentat i (IV) elució dels anàlits d'interès.

(1) Condicionament de la columna

Abans de començar l'adsorció dels anàlits a la fase estacionària, l'adsorbent s'ha de condicionar i fer-lo compatible amb la solució de la mostra. Per exemple, en una extracció de substàncies hidrofòbiques d'una solució de polaritat mitjana ha d'existir un contacte molt íntim entre la fase apolar (tal com la sílica C_{18}) i la solució polar. Sense cap pretractament, el líquid polar flueix en petits canals a través de la fase sòlida sense mantenir el contacte necessari. El pretractament implica l'ús d'un solvent intermig que permeti un millor contacte superficial entre les fases. Aquest solvent humiteja el material empaquetat i solvata els grups funcionals de l'adsorbent, el que dóna lloc a l'anomenada activació de la fase estacionària (**Figura 3.3**). D'aquesta manera també s'elimina l'aire present a la columna i els espais buits s'omplen de solvent. Els solvents habituals de condicionament per a fases apolars són el metanol o l'n-hexà, seguits d'un

rentat amb aigua o amb tampó aquós. Cal evitar que la fase estacionària s'assequi durant aquest pas, ja que si es fa el buit durant alguns minuts l'adsorbent s'hauria de tornar a condicionar. Si el condicionament no és adequat, el mecanisme d'adsorció no serà efectiu i les recuperacions dels anàlits no seran les esperades.

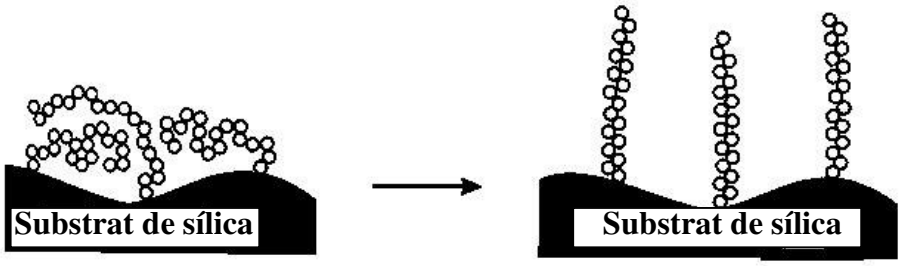


Figura 3.3. Activació d'una fase C_{18} amb un solvent adient.

Es pot afegir una segona etapa de rentat de l'adsorbent durant el condicionament. Es passa el dissolvent d'elució dels anàlits o un altre dissolvent el més semblant possible després del primer rentat amb metanol/hexà per tal d'eliminar possibles impureses del material adsorbent. Abans de l'aplicació de la mostra es passa una mica més de metanol i tampó aquós. Aquesta etapa permet maximitzar la retenció dels anàlits a la fase sòlida, sobretot per al cas de mostres aquoses, ja que s'equilibra el sòlid amb les condicions posteriors. Per determinats adsorbents, com per exemple els sòlids extractants de matriu polimèrica, no és necessari aquest pas a causa de les seves característiques físico-químiques [4].

(2) Aplicació de la mostra / Adsorció dels anàlits

Depenent del tipus de mostra que es vol tractar, es passa per la columna el volum de mostra adequat per gravetat, amb bombes, aplicant el buit o amb un sistema automatitzat. És important que els anàlits quedin retinguts a la columna mentre es va passant la mostra. Per aquest motiu, una part important en el desenvolupament dels mètodes de SPE és l'estudi del flux de càrrega de la mostra, que ha de ser constant. Aquest flux dependrà de les dimensions de la columna i de la mida de partícula del sòlid

adsorbent. Les columnes empaquetades amb partícules petites (~5 µm) són més eficients que les empaquetades amb partícules més grans (~10 µm) i per això permeten fluxos majors. Els mecanismes de retenció que poden tenir lloc inclouen interaccions de Van der Waals (també anomenades no polars, hidrofòbiques, de partició o de fase invertida), ponts d'hidrogen, forces dipol-dipol, exclusió de tamany i bescanvi iònic. Durant el pas de la mostra, els anàlits es concentren en l'adsorbent. Alguns components de la matriu també poden quedar retinguts mentre que d'altres no, aconseguint així una purificació de la mostra.

(3) Rentat / Eliminació d'interferències

L'objectiu d'aquesta etapa és eliminar selectivament els compostos no desitjats adsorbits a la fase sòlida (interferències) sense eluir els anàlits. Idealment, s'escolleix un dissolvent que sigui miscible amb la matriu de la mostra i en el qual els anàlits siguin poc solubles, tot i que aquesta elecció no sol ser fàcil. En la majoria de casos, el dissolvent de rentat adequat està format per aigua que conté un 5-20% d'un dissolvent orgànic. El volum típic de solució de rentat és 1-2 mL per cada 100 mg d'adsorbent. El flux de rentat s'hauria d'ajustar a aquell en el que el dissolvent estigui en contacte amb l'adsorbent durant 1-2 minuts [4].

Pot ser necessària una etapa d'assecat de l'adsorbent per eliminar aigua si el dissolvent d'elució que s'utilitzarà a la darrera etapa és immiscible amb aigua. Aquest assecat es pot dur a terme sota atmosfera de nitrogen, al buit o per centrifugació (útil en cas d'anàlits volàtils). El temps d'assecat pot variar de 30 segons a 30 minuts, segons les característiques del sistema. En cas que l'eluent sigui miscible en aigua l'etapa d'assecat es pot reduir o eliminar, assumint que llavors part de l'aigua serà eluïda en el pas següent. Alguns adsorbents no permeten aquesta etapa d'assecat, ja que la presència d'aire modificaria l'empaquetament de tal manera que no permetria un bon contacte entre la fase sòlida i el posterior dissolvent d'elució.

(4) Elució dels anàlits

En aquest darrer pas, els anàlits retinguts són eluïts del sòlid adsorbent amb un dissolvent adequat específicament escollit per trencar els diferents tipus d'interaccions anàlit-adsorbent. L'elecció del dissolvent d'elució adequat és crítica, ja que ha de

permetre l'elució completa dels anàlits i la no elució dels interferents adsorbits amb el mínim volum d'elució possible. El dissolvent d'elució ha de ser compatible amb les tècniques d'anàlisi que s'utilitzaran a continuació. Així, si s'utilitza la cromatografia de gasos, el dissolvent d'elució haurà de tenir un punt d'ebullició baix; també ha de ser el més pur possible per a no distorsionar els pics cromatogràfics.

Un volum habitual d'elució és 250 µL per cada 100 mg d'adsorbent. El flux d'elució també és important per assegurar la reproduïbilitat. S'aconsella fer l'elució amb volums petits d'eluent, permetent un contacte entre eluent-fase sòlida d'entre 1 i 4 minuts, ja que l'eficiència és més gran respecte l'ús d'una sola alíquota d'elució major [4].

3.1.1. ADSORBENTS EN SPE

L'extracció en fase sòlida es porta a terme utilitzant diferents tipus d'adsorbents amb unes característiques físiques i químiques adequades. La naturalesa del material base i dels grups funcionals addicionals en determinaran les aplicacions. Existeix una gran varietat de fases sòlides utilitzades en SPE. Els sòlids de sílica modificada, especialment octadecilsilà (ODS), són els tipus més utilitzats actualment. No obstant, també s'utilitzen diverses resines polimèriques poroses. Els materials de carbó actiu i, més recentment, de carbó grafititzat constitueixen una altra tipus de partícules sòlides per a SPE.

Les propietats desitjables d'aquests sòlids per ser útils per a SPE són:

- **Porositat i àrea superficial**. L'extracció dels anàlits de la mostra depèn d'un equilibri entre els soluts presents a la mostra i al sòlid adsorbent. Aquest equilibri es desplaça més fortament cap al sòlid si l'àrea superficial és gran. Per tal que la SPE sigui efectiva generalment calen àrees superficials superiors a 100 $m^2 \cdot g^{-1}$, tot i que actualment les partícules que s'utilitzen tenen àrees superficials entre 200 i 800 $m^2 \cdot g^{-1}$. La mida de porus del sòlid i la seva àrea superficial solen estar relacionats inversament i l'àrea superficial disminueix quan la mida de porus augmenta.

- **Adsorció reversible.** La SPE ha de complir dos requeriments importants: (i) un percentatge alt i reproduïble d'anàlits han de ser extrets pel sòlid adsorbent i (ii) aquests han de ser eluïts fàcil i completament del sòlid.

- **Puresa.** Les partícules sòlides cal que estiguin lliures d'impureses ja que aquestes podrien coeluïdes amb els anàlits i interferir en l'anàlisi cromatogràfica.

- Estabilitat química. En alguns casos pot ser necessari treballar a valors de pH extrems. Els adsorbents de sílica no són gens estables a valors de pH superiors a 8 ni a valors inferiors a 2. En canvi, les resines polimèriques són força estables tant en medis àcids com bàsics. També cal que les partícules sòlides siguin estables en els dissolvents orgànics que s'utilitzen en l'elució, així com en les mostres aquoses. Les resines polimèriques haurien de ser suficientment entrecreuades per assegurar que no es dissolen o debiliten amb el contacte amb els dissolvents orgànics.

- Factor de capacitat. Es defineix com la relació entre la quantitat d'anàlit que es troba adsorbit en la fase sòlida respecte a la quantitat que resta en la fase líquida. En SPE interessarà sempre que aquest valor sigui el més alt possible.

Actualment tots els adsorbents es fabriquen sota unes condicions dissenyades per proveir un material molt porós, rígid i amb una gran àrea superficial. Existeixen dues maneres de fabricar aquests materials que donaran diferent tipus d'adsorbents: (i) per formació d'un gel que proporciona partícules sòlides de formes irregulars d'una mida adequada per a SPE i (ii) per formació de partícules individuals que proporciona partícules esfèriques. Els sòlids adsorbents més típics són els que s'indiquen als següents apartats.

3.1.1.1. Adsorbents de sílica de fase lligada

Actualment els materials de sílica de fase lligada són els més utilitzats en SPE a causa de la seva àmplia disponibilitat. La superfície de les partícules és heterogènia, amb una gran varietat de grups silanol. L'àrea superficial específica de la sílica va dels 100 a 850 $m^2 \cdot g^{-1}$, tot i que els valors més habituals per a SPE són de 200 a 600 $m^2 \cdot g^{-1}$. Generalment, les partícules tenen una mida irregular amb un diàmetre de 40 µm de mitjana, un tamany de porus mitjà de 60 Å i una àrea superficial mitjana de 500 $m^2 \cdot g^{-1}$.

La sílice es pot utilitzar sense modificar com un adsorbent en SPE. Per ampliar la seva aplicabilitat i les opcions a l'hora d'escollir el mecanisme apropiat d'adsorció, la superfície del material de sílica es modifica sovint amb una gran varietat de grups funcionals. La naturalesa de la funcionalitat pot ser no-polar (e.g. C_{18}), polar (e.g. NH_2), iònic (e.g. àcid propilsulfònic) o mode mixt (e.g. C_8/bescanvi catiònic). En general, tots els adsorbents tenen un cert caràcter hidrofòbic a causa de la naturalesa de la seva matriu, mentre que la naturalesa hidrofòbica dels adsorbents basats en sílica dependrà dels grups amb que s'hagin funcionalitzat.

3.1.1.2. Sòlids adsorbents de carbó

Dins d'aquest tipus s'inclouen els materials de carbó actiu i els de carbó grafititzat, que estan esdevenint cada vegada més populars. Les seves propietats varien força d'un tipus de carbó a un altre. Les avantatges d'aquest tipus de material són la seva elevada àrea superficial i les fortes propietats d'adsorció. Per altra banda, l'elució dels anàlits adsorbits sol ser lenta i incompleta. A més, l'activitat catalítica de la superfície del carbó també pot ser problemàtica.

3.1.1.3. Resines de matriu polimèrica

Els polímers orgànics consten d'una matriu de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB) o de poliacrilat, les característiques de la qual determinaran les seves aplicacions. Aquests polímers presenten certes avantatges respecte els carbons actius i les síliques de fase lligada pel que fa a SPE. Respecte a la sílica, les resines polimèriques poden treballar gairebé a qualsevol pH i l'àrea superficial sol ser més elevada, de manera que l'adsorció de compostos orgànics sol ser més completa. En la majoria de casos els anàlits adsorbits són eluïts fàcil i completament dels adsorbents polimèrics amb un volum petit de dissolvent orgànic. Aquestes resines són hidrofòbiques i ofereixen un mecanisme de retenció simple i poc selectiu. Aquests polímers presenten unes propietats comunes que afecten de forma important els mecanismes de retenció [5]:

- **Mida de partícula:** Segons la mida de partícula els polímers es classifiquen en perles o grànuls (entre 0.04 i 1 mm), pols (~30 µm) i polímers ultrafins (entre 0.5 i 1.5 µm). La mida de partícula es tria segons el procés on s'ha d'utilitzar el polímer, ja que pot tenir una influència important en la cinètica en el cas de bescanvi iònic. És recomanable que la mida de les partícules sigui el més homogènia possible.

- **Grau d'entrecreuament:** es refereix al percentatge d'agent entrecreuant, generalment divinilbenzè (DVB), que s'ha addicionat al poliestirè (PS) en el procés de polimerització. Els polímers comercials acostumen a contenir entre un 1% i un 32% d'agent entrecreuant. Té una gran influència en les característiques físiques del polímer (porositat, estabilitat mecànica i química, capacitat d'inflament). Els adsorbents amb un baix grau d'entrecreuament són tous i tenen una baixa resistència. La capacitat d'inflament augmenta en disminuir el grau d'entrecreuament, mentre que la selectivitat disminueix.

- **Porositat:** la porositat d'un polímer i l'estructura de la xarxa polimèrica formada estan directament relacionades amb el grau d'entrecreuament. Per descriure el caràcter porós d'un material polimèric s'utilitzen els termes macroreticulars o macroporós i microporós o tipus gel. El terme macroporós es refereix a estructures en les quals els porus són superiors a les distàncies atòmiques i, per tant, no formen part de l'estructura del polímer. En canvi, l'expressió microporós es refereix a la porositat aparent de dimensions atòmiques (10Å), que depèn de la capacitat d'inflament del polímer i de les condicions que l'envolten.

- **Capacitat d'inflament:** els adsorbents polimèrics poden variar de volum a causa de la penetració en la seva estructura del solvent. El canvi de volum que experimenta depèn de la composició de la dissolució envolvent, de la naturalesa de la matriu polimèrica i el seu grau d'entrecreuament, la densitat de càrrega i el tipus de contraions. Aquests canvis de volum que experimenten les resines quan són transferides d'un medi a un altre es coneix com a inflament ("*swelling*").

Tot i que els materials polimèrics s'han utilitzat àmpliament sense cap mena de modificació (el material XAD ha tingut un impacte significatiu en SPE), també s'han introduït grups funcionals en la seva estructura per tal d'ampliar-ne la seva aplicabilitat. La possibilitat d'afegir grups hidrofílics a la superfície del material adsorbent permet millorar el poc contacte superficial entre fases líquides polars en aquest tipus de material, que és hidrofòbic.

La tendència actual és la de desenvolupar noves metodologies que utilitzen adsorbents cada vegada més adaptats a la necessitat de cada anàlisi. Es poden millorar els resultats per compostos polars utilitzant adsorbents polimèrics funcionalitzats amb grups polars, preparant nous tipus de polímers a partir de monòmers hidrofílics i amb l'ajuda d'un agent entrecreuador, utilitzant fases sòlides que proporcionin interaccions selectives amb els anàlits i derivatitzant els compostos polars prèviament al procés SPE per incrementar la seva hidrofilicitat. La retenció de compostos polars amb matrius de PS-DVB millora quan s'hi addicionen grups polars a l'estructura del polímer.

3.1.2. FORMATS SPE DISPONIBLES COMERCIALMENT

Els formats comercials més habituals en SPE són la columna i el cartutx. Aquests poden ser de polipropilè o vidre i contenen diferents tipus i quantitats d'adsorbent (de 100 mg a 1 g) entre dos frites d'acer inoxidable o polietilè. El seu disseny varia depenent de la casa comercial.

Un altre format comercial són els discs. Aquests estan disponibles en tres dissenys diferents: els consistents en una xarxa de microfibres de politetrafluoroetilè flexible sobre la qual hi ha suspeses les partícules de l'adsorbent, els discs de matriu de fibra de vidre i l'empresa J.T. Baker ha introduït un nou tipus de discs coneguts com a Speedisks [1,3]. El primer tipus de discs és el més habitual; les dimensions més utilitzades són de 4 a 90 mm de diàmetre (47 mm és el diàmetre estàndard) i 0.5 mm de gruix [1]. Thurman i Snavely [6] han descrit els avanços més recents en el camp de discs emprats en SPE en l'anàlisi de mostres ambientals.

L'ús dels discs comporta avantatges respecte als cartutxos que es poden justificar degut a la seva major àrea superficial, el seu llit més estret, l'homogeneïtat en l'estructura i la seva estabilitat. Malgrat els avantatges dels discs respecte als cartutxos i columnes, aquests últims segueixen sent més utilitzats actualment degut al nombre limitat d'adsorbents disponibles comercialment en format de disc. No obstant, els cartutxos presenten l'avantatge de requerir menys volum de dissolvent que els discs [7,8]. En un estudi comparatiu, Viana et al. [9] van obtenir millors recuperacions per a un conjunt de plaguicides emprant cartutxos. En aquest estudi l'adsorció es va realitzar amb discs (47 mm) i cartutxos de C_8 i C_{18} (500 mg), i es va observar que les recuperacions són superiors per als cartutxos, comparant un mateix tipus d'adsorbent.

3.1.3. ACOBLAMENT "ON-LINE" DE SPE A LES TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES

L'extracció en fase sòlida pot ser realitzada "*off-line*" o bé acoblada "*on-line*" al sistema cromatogràfic. En ambdós modes el procés es realitza de manera similar, excepte per al pas de desorció. En l'acoblament "*on-line*" els anàlits retinguts són eluïts directament des de la precolumna cap a la columna analítica del sistema cromatogràfic. Els avantatges i les limitacions han estat àmpliament discutits en la bibliografia [10]. En l'acoblament "*on-line*" els adsorbents solen ser continguts en precolumnes, tot i que

també es poden utilitzar discs en un dispositiu especial que permet emprar diferent nombre i tipus de discs [11,12].

El mecanisme "*off-line*" ha estat aplicat més extensament que l'acoblament "*on-line*" degut a la seva major simplicitat. Malgrat tot, la tendència en els darrers anys ha estat un considerable augment en la utilització de l'acoblament "*on-line*" pels nombrosos avantatges que presenta, entre els quals es pot destacar la no manipulació de la mostra entre l'adsorció i l'anàlisi i, com a conseqüència, s'evita el risc de pèrdua i contaminació, obtenint-se millors límits de detecció i quantificació. A més, s'analitza tot l'extracte i, per tant, permet reduir considerablement el volum de mostra a preconcentrar així com el volum de dissolvents orgànics. També presenta un potencial major d'automatització [13,14]. Malgrat tot, sembla que la SPE en mode "*off-line*" tindrà un paper important en anàlisis de mostres complexes degut a la seva gran flexibilitat i al fet que permet analitzar el mateix extracte mitjançant diverses tècniques [15].

La SPE s'ha acoblat "*on-line*" a diferents tècniques cromatogràfiques com són la cromatografia de gasos (GC) [16], la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) [17], la cromatografia de fluids supercrítics (SFC) [18] i, més recentment, a l'electroforesi capil·lar (CE) [19]. La tècnica HPLC és la més utilitzada per determinar compostos polars, ja que la CG requereix derivatització dels anàlits per millorar la seva volatilitat. A més, l'acoblament SPE-HPLC és més senzill que l'acoblament SPE-GC ja que aquest últim requereix un pas addicional d'assecat de l'adsorbent previ a la desorció i també una interfase per volatilitzar i eliminar l'eluent emprat per desorbir els anàlits [20]. Aquest acoblament SPE-HPLC ha estat àmpliament utilitzat en la determinació de contaminants en aigües, com són plaguicides [20,21], compostos fenòlics [22] i ftalats [23], entre d'altres. L'acoblament de la SPE-SFC també requereix un pas addicional d'assecat de l'adsorbent abans de la desorció dels anàlits, encara que en aquest cas és la pròpia fase mòbil la que elueix els anàlits retinguts a la precolumna. Una aplicació de l'acoblament "*on-line*" SPE-CE és la portada a terme per Veraart et al. [24] en la què part de l'eluent emprat en la desorció dels anàlits és introduït directament en el capil·lar.

Malgrat els avantatges que presenta l'acoblament "*on-line*" SPE-HPLC, també cal esmentar alguns inconvenients, com ara que les petites dimensions de la precolumna, la quantitat d'adsorbent oscil·la entre 20 i 100 mg, poden provocar una baixa retenció dels anàlits; la solució és seleccionar un adsorbent amb major capacitat de retenció [1,15]. Una segona limitació d'aquest acoblament és la possible

incompatibilitat entre l'adsorbent de la precolumna i el de la columna analítica. L'adsorbent de la columna analítica ha de tenir la capacitat de retenció igual o superior a la de l'adsorbent de la precolumna i, a més, la precolumna ha de ser el més petita possible, per tal d'evitar l'eixamplament dels pics [13,25]. S'han proposat solucions per evitar l'eixamplament de pics, tals com utilitzar un gradient d'elució que provoqui la compressió dels anàlits a l'entrada de la columna analítica [13] o bé eluir els anàlits de la precolumna en contracorrent [26]. Recentment, s'ha demostrat que l'augment de la temperatura de l'eluent emprat en la desorció millora l'eficàcia de la SPE acoblada "*on-line*" a HPLC, aquest mètode és conegut com a desorció tèrmicament assistida (TDA) [27,28].

Un altre mètode desenvolupat per a la millora dels resultats consisteix en l'acoblament de dues columnes analítiques (LC-LC). La primera columna ha de permetre la separació eficaç dels anàlits i de les substàncies interferents de la mostra, en la segona columna té lloc la separació analítica dels anàlits a determinar. Aquest tipus d'acoblament ha estat aplicat en l'anàlisi d'aigües per a la determinació de plaguicides [29-31].

3.1.4. PROBLEMÀTICA EN LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS POLARS

Els adsorbents convencionals emprats per a l'extracció de compostos orgànics en aigua no són capaços de retenir els anàlits més polars i, per tant, donen baixes recuperacions per a aquests compostos. A més, en l'anàlisi de mostres ambientals mitjançant SPE i cromatografia líquida de fase invertida apareix una banda a l'inici dels cromatogrames que dificulta la determinació dels anàlits que elueixen abans, és a dir, els anàlits amb major caràcter polar. Aquesta banda correspon a la interferència de la matriu deguda a les substàncies húmiques i fúlviques presents en aquest tipus de mostres complexes, la qual és més important com més gran sigui la capacitat de retenció de l'adsorbent emprat en l'adsorció [32,33].

Per tal d'eliminar o reduir aquestes interferències s'han desenvolupat una sèrie de mètodes que faciliten la quantificació dels anàlits més polars en mostres d'aigua amb alt contingut de matèria orgànica. Bonifazi et al. [34,35] han aconseguit reduir aquesta banda mitjançant un tractament químic de la mostra amb permanganat sòdic, abans del procés d'adsorció, d'aquesta manera les substàncies húmiques són oxidades. Un altre reactiu químic utilitzat amb el mateix objectiu és el sulfit sòdic que transforma els àcids

húmics en compostos de major polaritat que no queden retinguts en els adsorbents i així s'obtenen extractes més nets [36].

Un altre mètode consisteix en l'ús de materials d'accés restringit (MAC) que es caracteritzen per la limitada accessibilitat de macromolècules, com ara les substàncies húmiques de la mostra, als llocs actius del suport porós. Els diferents tipus existents d'aquests materials i les seves diferents aplicacions es troben descrits a la bibliografia [37,38]. Un exemple d'aquestes aplicacions és el treball de Önnerfjord et al. [26] que han emprat un MAC de sílica alquil-diol com a precolumna per a la preconcentració "*on-line*" d'una sèrie de triazines en aigua de riu. Malgrat obtenir una bona reproduïbilitat, no és suficient per als anàlits més polars (recuperacions inferiors al 10%) i la interferència de la matriu no és eliminada totalment. Hogendoorn et al. [30] també han utilitzat diversos materials d'aquest tipus com a columnes analítiques (en LC o com a primera columna en l'acoblament LC-LC) o com a adsorbents per a SPE en la determinació d'un grup d'herbicides polars en mostres d'aigua amb un alt contingut de matèria orgànica. Els autors han obtingut recuperacions superiors al 85% per a tots els anàlits i, a més, han aconseguit eliminar considerablement la interferència de la matriu.

Un altre mètode és el portat a terme per Pichon et al. [39], amb el qual han evitat la coextracció dels àcids húmics i fúlvics amb una sèrie de plaguicides polars. Els anàlits han estat retinguts en forma iònica (a pH = 7) en un polímer altament entrecreuat obtenint bones recuperacions. En canvi, part de les substàncies húmiques no han estat retingudes en aquest adsorbent i s'observa una disminució considerable de la interferència de la matriu. Els autors expliquen aquesta disminució pel fet que les substàncies húmiques estan poliionitzades a aquest pH i no poden ser retingudes en l'adsorbent; en canvi a pH àcid poden interaccionar fàcilment donant la banda inicial ja esmentada. Un mètode similar és el realitzat per Geerdink et al. [40], en aquest treball es preconcentren una sèrie d'herbicides polars a pH àcid i s'aconsegueix reduir la banda inicial mitjançant un posterior rentat de la precolumna amb una dissolució de NaOH (pH = 11), amb la que s'elueixen les substàncies húmiques mentre que els anàlits es mantenen retinguts en l'adsorbent.

Un mètode alternatiu és l'extracció de compostos fàcilment ionitzables en dues etapes, ja sigui en mode "*off-line*" o "*on-line*", emprant discs o cartutxos [41,42] o precolumnes [43,44] en sèrie. Aquest mètode ha estat aplicat a plaguicides [41,42] i compostos fenòlics [43,44] en mostres ambientals aquoses. Mitjançant aquest mètode, les substàncies húmiques i els anàlits d'interès són retinguts en adsorbents diferents,

permetent l'elució dels anàlits cap a la columna analítica sense interferència de la matèria orgànica de la matriu.

Malgrat aquests avenços, la determinació de compostos d'elevada polaritat encara presenta limitacions importants en el cas de l'anàlisi de mostres de sòls. Cal desenvolupar una metodologia que permeti l'anàlisi de 2,4-D, MCPA i els seus derivats fenòlics en mostres de sòl utilitzant un metòde de "*clean-up*" i de preconcentració per aconseguir la determinació quantitativa dels anàlits presents a nivells traça en el sòl. Així doncs, l'objectiu d'aquest capítol serà desenvolupar una metodologia d'extracció en fase sòlida per a 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics que permeti una etapa de concentració i "*clean-up*" conjunta dels extractes de mostres de sòls provinents del camp de golf "*Serres de Pals*". S'avaluaran diferents adsorbents per tal de buscar les millors condicions per tos ells.

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. REACTIUS

- Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D): sòlid, 98.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA): sòlid, 97.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-metilfenol (2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-clorofenol (2-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-clorofenol (4-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2,4- diclorofenol (2,4-DCP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid o-fosfòric (H_3PO_4): líquid, 85 %, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Hidròxid sòdic (NaOH): sòlid, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Metanol (CH_3OH): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Hexà (C_6H_{14}): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Acetona (C_3H_6O): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Hidròxid de tetrabutilamoni (TBA-OH): líquid, Fluka, Buchs, Suïssa.

3.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolucions estoc de 2,4-D, MCPA, 2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP (c.a. 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$). Es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua Milli-Q.
- Dissolucions de treball per dilució dels estocs en aigua o metanol.

3.2.3. APARELLS I MATERIALS

- Cromatògraf líquid Shimadzu (Kyoto, Japó) que incorpora injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) amb bucle de 20 µL, 2 bombes LC-9A, detector UV-Visible SPD-6AV, registrador Chromatopac C-R6A, columna cromatogràfica de 20 cm x 0.46 cm i.d. empaquetada amb fase sílica Kromasil 100 C18 ODS (Teknokroma, Barcelona, Espanya). Per protegir la columna analítica es va emprar una precolumna ODS (TR-C-160-1, Teknokroma, Barcelona, Espanya). El flux de la fase mòbil és de 1 $mL \cdot min^{-1}$ i l'anàlisi es realitza a 25±1ºC.
- Bomba peristàltica Minipuls 3 M312 (Gilson, Villiers Le Bel, França).
- Bany d'ultrasons (P. Selecta, Abrera, Espanya) per desgasificar les fases mòbils.
- Agitador rotatori (Dinko, Barcelona, Espanya).
- Centrífuga Mixtasel (Selecta, Barcelona, Espanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de mida de porus 0.45 µm (Whatman, Maidstone, UK).
- pHmetre GLP22 (Crison, Barcelona, Espanya).
- Balança analítica electrònica A200S amb tolerància ±0.1 mg (Sartorius Analytic, Göttingen, Alemanya).
- Sistema de purificació d'aigua Milli-Q (Millipore Ibérica, Barcelona, Espanya).
- Filtres de membrana de 0.45 µm (Whatman, Maidstone, UK).
- Xeringa per a HPLC de 100 µL (Hamilton, Bonaduz, Suïssa).
- Mostrejador de sòls Eijkelkamp, "*ring kit*" 07.53.SC (Agrisearch Equipment, Giesbeek, Holanda).

Adsorbents utilitzats en SPE:

- Cartutx de columna Bakerbond SDB-1: 200 mg d'adsorbent polimèric d'àrea superficial 933 $m^2 \cdot g^{-1}$, 30 nm com a mida de porus i 3 mL de volum (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Cartutx de columna AccuBond II ODS: 500 mg d'adsorbent de 546 $m^2 \cdot g^{-1}$ d'àrea superficial, 6 nm de mida de porus i 3 mL de volum (Agilent Technologies UK Ltd., West Lothian, UK).
- Resina Amberlite XAD-2: àrea superficial de 330 $m^2 \cdot g^{-1}$ i 9 nm de mida de porus (Sigma, St.Louis, MO, USA). La reïna ha estat netejada per mitjà

d'extracció amb Soxhlet utilitzant metanol, hexà, acetona i metanol (12 hores cada dissolvent) i conservada en metanol fins a la seva utilització [45]. Una alçada fixa de reïna s'empaqueta en una columna de vidre de 10 mm de diàmetre intern per realitzar els experiments de concentració i "*clean-up*" de les mostres.

3.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

El mètode de SPE desenvolupat ha estat aplicat a la determinació de 2,4-D, MCPA i els seus derivats fenòlics en sòls provinents del camp de golf Serres de Pals (Girona, Espanya), estudiant cada etapa del procés per obtenir les millors condicions per a l'anàlisi.

3.2.4.1. Presa de mostra de sòls

S'agafaren mostres de sòl d'una parcel·la del camp de golf a diferents localitzacions i a diferents profunditats. Les mostres es van prendre mitjançant un mostrejador de sòls Eijkelkamp® que permet arribar a profunditats compreses entre 0 i 90 cm respecte al nivell superficial.

3.2.4.2. Extracció de 2,4-D i metabòlits fenòlics

Es desenvolupa un procediment per a l'extracció dels herbicides i els seus derivats fenòlics de les mostres de sòl. Les mostres s'assequen a temperatura ambient al laboratori, es passen a través d'un tamís de 2 mm de mida i es conserven en ampolles de vidre de color àmbar a -4ºC per prevenir la degradació dels anàlits.

En un primer pas es realitza una extracció dels anàlits d'interès de les mostres de sòl amb hidròxid sòdic amb ajuda d'un agitador rotatori a 30 rpm durant 30 minuts a 25±1ºC. Un cop realitzada l'extracció es centrifuga l'extracte a 2000 rpm durant 20 minuts per separar el sòl del sobrenedant i aquest es filtra amb filtres de membrana 0.45 µm. Aquest sobrenedant és el que conté els anàlits d'interès i és el que es passa a través dels cartutxos d'extracció en fase sòlida mitjançant una bomba peristàltica per tal de concentrar i realitzar el "*clean-up*".

A continuació es citen molt breument les etapes seguides en el procés de concentració i "*clean-up*" de les mostres en el procés d'extracció en fase sòlida, fins a l'anàlisi cromatogràfica. Cal dir que en aquesta etapa de desenvolupament del mètode SPE es proven tres tipus d'adsorbents per tal de seleccionar el material més adequat:

(1) condicionament de l'adsorbent amb 5 mL de metanol

(2) rentat de l'adsorbent amb 10 mL d'aigua

(3) aplicació de la mostra

(4) rentat de l'adsorbent amb 5 mL d'aigua

(5) assecat de l'adsorbent sota condicions de buit durant 30 s

(6) desorció dels plaguicides i derivats fenòlics amb metanol:aigua (50:50) o metanol

(7) injecció directa de 20 µL de la dissolució d'elució a l'HPLC

Els pas (5) no es realitza quan s'utilitza la resina XAD-2 com a adsorbent per a l'extracció en fase sòlida.

Per tal de reproduir les condicions de matriu de les mostres es fortifiquen amb els analits d'interès els extractes de sòls provinents de l'extracció alcalina (líquid sobrenedant producte de l'extracció del sòl posat en contacte amb hidròxid sòdic) on hi ha presents els àcids húmics i fúlvics del sòl. Aquests extractes es fortifiquen a diferents nivells per a cada anàlit i es passen a través de l'adsorbent en qüestió. Aquest procediment ens permet realitzar la determinació de les recuperacions dels anàlits en la mateixa matriu que la obtinguda a les mostres de sòl. Així un cop vist que el mètode funciona per a extractes fortificats, es pot aplicar a mostres de sòl on es desconeix la concentració d'anàlit a determinar.

Per a la validació del mètode es van utilitzar sòls fortificats mitjançant dos procediments diferents. En un primer procediment, anomenat "*spot spiking*", 5 g de sòl són fortificats amb 1 mL de dissolució que conté els anàlits en metanol. Immediatament després de la fortificació es procedeix a l'extracció alcalina, posant en contacte els 5 g de sòl fortificats amb 10 mL de NaOH 0.01 M. L'interval de concentració dels anàlits en el sòl fortificat varia de 1 a 100 $\mu g \cdot g^{-1}$. A partir d'aquí les etapes coincideixen amb les descrites anteriorment. En un segon procediment de fortificació, s'ha utilitzat una variació del primer que consisteix en agafar porcions de 5 g de sòl que són fortificades amb un sol anàlit a concentracions de 3 $mg \cdot kg^{-1}$ i assecats a l'aire durant 24 hores abans de procedir a l'extracció alcalina.

3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En el desenvolupament de la metodologia per a la determinació de 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics s'han avaluat les millors condicions en totes les etapes implicades en el procés, tals com l'extracció dels anàlits del sòl i l'etapa de concentració i "*clean-up*" de la mostra.

3.3.1. DESENVOLUPAMENT DE L'EXTRACCIÓ ALCALINA

En estudis previs [46,47] s'ha comprovat que l'extracció d'àcids fenoxiacètics i clorofenols en sòls pot ser portada a terme quantitativament amb hidròxid sòdic. Un estudi recent [48] mostra recuperacions superiors al 90% per a una àmplia gamma de clorofenols provinents d'un sòl certificat utilitzant hidròxid sòdic en l'extracció. La utilització de l'extracció alcalina per a compostos polars en sòls és preferible a l'extracció amb dissolvents orgànics degut a que una gran quantitat d'interferents i impureses poc polars es mantenen en el sòl. A més, el procediment és més senzill i no requereix la utilització de dissolvents orgànics perillosos. El principal inconvenient de l'extracció alcalina és que les substàncies húmiques i fúlviques presents en el sòl es coextreuen amb els anàlits d'interès.

Per l'estudi de l'extracció s'ha utilitzat el segon dels procediments explicats a l'apartat Experimental per a la fortificació de sòls. S'agafen quantitats predeterminades de sòl, es fortifiquen amb cada anàlit individualment i s'assequen durant 24 hores. Passat aquest temps, els sòls fortificats es posen en contacte amb dissolucions d'hidròxid sòdic a diferents concentracions. El líquid sobrenedant obtingut es passa per l'adsorbent (en aquest cas s'ha utilitzat el cartutx comercial Bakerbond) per tal d'aconseguir el "*clean-up*" de la mostra i finalment es realitza el seu anàlisi per IP-HPLC (mètode d'anàlisi desenvolupat al **Capítol 2**). Serà necessari disposar d'un mètode robust i eficaç de "*clean-up*" per tal d'obtenir cromatogrames integrables, sense la presència de matèria orgànica que impedeix la quantificació dels anàlits més polars.

Estudis cinètics preliminars mostren que amb 30 minuts és suficient per aconseguir l'equilibri en l'extracció alcalina. Els resultats de la **Taula 3.1** mostren que la concentració d'extractant no afecta de forma significativa a la recuperació dels àcids fenoxiacètics (2,4-D i MCPA). Això és degut a la seva elevada polaritat i als valors baixos de pK_a d'aquests dos compostos (2.98 i 3.14 per al 2,4-D i MCPA,

respectivament). Aquests dos factors expliquen per què aquests dos compostos també s'extreuen als mateixos nivells utilitzant només aigua.

Taula 3.1. Recuperacions (%) dels anàlits en sòls i les seves incerteses (± $t \cdot s \cdot n^{(-1/2)}$, α=0.05), obtingudes a diferents concentracions d'extractant.
Condicions experimentals: 5 g de sòl fortificat a 3 $mg \cdot kg^{-1}$ amb cada anàlit individualment, assecats durant 24 h, extracció alcalina amb 10 mL d'extractant en un agitador rotatori durant 30 minuts. "*Clean-up*" i concentració amb el cartutx SDB-1, elució amb 5 mL de metanol (3 replicats per a cada cas).

Anàlit	**[NaOH] (M)**			
	0.1	**0.01**	**0.001**	**0.0001**
MCPA	71 ± 8	76 ± 3	67 ± 10	76 ± 13
2,4-D	67 ± 10	76 ± 14	71 ± 11	76 ± 12
2-CP	85 ± 6	79 ± 5	74 ± 4	68 ± 8
2,4-DCP	89 ± 12	84 ± 10	79 ± 10	48 ± 15

L'extracció dels derivats clorofenòlics, per contra, presenta una dependència amb la concentració d'agent extractant. L'augment en la hidrofobicitat i en el valor de pK_a d'aquests altres anàlits fa necessària la utilització de concentracions d'extractant elevades per poder tenir els compostos en la seva forma iònica que es la que permetrà l'extracció en la fase aquosa. Els resultats mostren que la variació en l'extracció quan la concentració d'hidròxid sòdic disminueix fins a 0.01 M no és significativa, mentre que concentracions més baixes donen lloc a disminucions importants en les recuperacions obtingudes. Amb la utilització d'aigua com a agent extractant no és possible l'extracció dels compostos clorofenòlics.

L'augment en la concentració d'hidròxid sòdic no tan sols afecta l'extracció dels metabòlits fenòlics sinó que també repercuteix directament sobre l'extracció dels àcids húmics i fúlvics presents en el sòl, els quals son extrets amb major quantitat quan més elevada és la concentració d'hidròxid sòdic. Això dóna lloc a eficiències de "*clean-up*" inferiors en el procés SPE. Tal i com es mostra a la **Figura 3.4,** quan els analits dels sòls

són extrets amb hidròxid sòdic 0.1 M apareix una gran desviació de la línea base al principi dels cromatogrames que dificulta la quantificació dels compostos més polars.

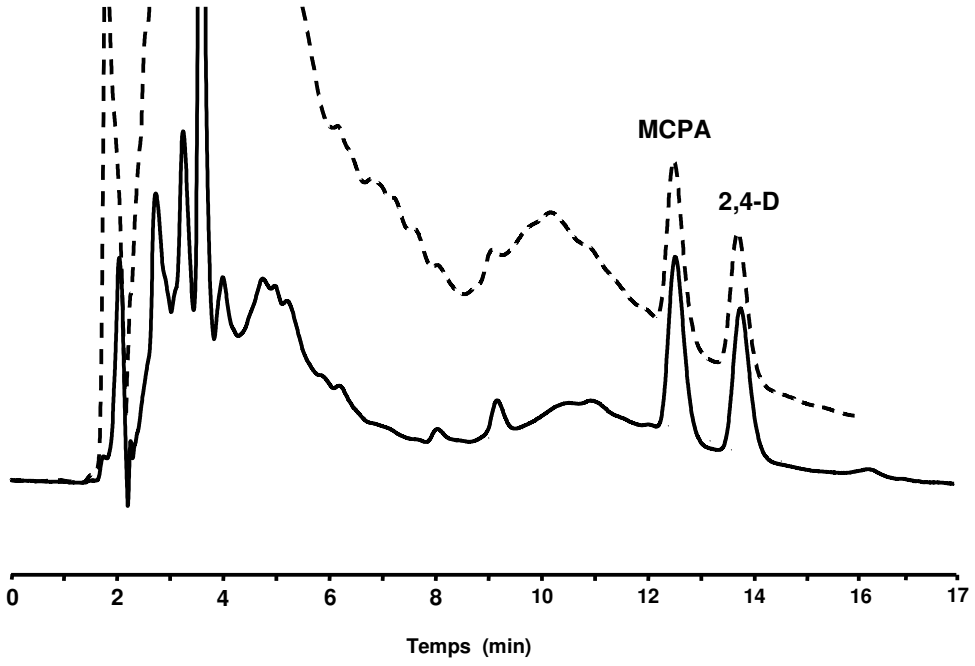


Figura 3.4. Cromatogrames obtinguts després de la preconcentració i "*clean-up*" mitjançant SPE amb els cartutxos Bakerbond SDB-1 per a mostres fortificades de sòl extretes amb hidròxid sòdic 0.1 M (línia discontínua) i hidròxid sòdic 0.01 M (línia contínua). Condicions experimentals iguals a les de la taula 3.1.

Es fixa una concentració d'hidròxid sòdic 0.01 M per a l'extracció alcalina ja que dóna recuperacions adequades per a tots els anàlits i el nivell de coextracció de substàncies húmiques i fúlviques és suficientment baix per permetre un adequat "*clean-up*". Una concentració superior d'hidròxid sòdic no millora l'extracció dels anàlits del sòl però, en canvi, afavoreix l'extracció d'àcids húmics i fúlvics del sòl que impedeix obtenir cromatogrames on es puguin quantificar correctament tots els anàlits d'interès. A concentracions d'hidròxid sòdic inferiors a 0.01 M s'obtenen cromatogrames que indiquen que no s'ha extret pràcticament la matèria orgànica, però no s'aconsegueix determinar quantitativament tots els metabòlits clorofenòlics.

3.3.2. SELECCIÓ DE L'ADSORBENT PER A SPE

Com s'ha vist a l'apartat anterior, la determinació de traces per a anàlits acídics extrets en mostres de sòls mitjançant HPLC queda afectada per la coextracció de substàncies húmiques i fúlviques, provocant una severa desviació en la línia base dels cromatogrames (**Figura 3.5**). Per aquesta raó és necessari tractar l'extracte de la mostra abans de l'anàlisi per HPLC per aconseguir un "*clean-up*" eficient de la mostra. Els adsorbents de SPE i les reïnes de poliestirè-divinilbenzè permeten obtenir un enriquiment i "*clean-up*" de contaminants orgànics polars en mostres aquoses de forma simultània [39,49,50]. Per seleccionar el millor adsorbent per a la concentració d'àcids fenoxiacètics i dels seus metabòlits fenòlics provinents de mostres de sòls, s'han avaluat dos cartutxos comercials (un adsorbent de base sílica de C_{18} i un adsorbent de poliestirè-divinilbenzè) i una resina de poliestirè-divinilbenzè, Amberlite (XAD-2).

Les dissolucions d'herbicides d'àcids fenoxiacètics són ajustades normalment a valors de pH≤ 2 per obtenir la seva forma protonada i permetre retencions quantitatives en adsorbents de sílica convencional [49,51]. Com es pot veure a la **Figura 3.5**, la retenció de l'herbicida 2,4-D a l'adsorbent de sílica convencional és quantitativa només a valors de pH ≤ 3; valors de pH superiors provoquen una disminució en la retenció de l'herbicida fins a nivells inferiors a un 10 %. Això indica que els adsorbents de sílica poden ser utilitzats sempre que la mostra sigui acidificada adequadament abans de procedir a l'extracció en fase sòlida. La necessitat d'ajustar el pH de la mostra introdueix una nova etapa en el tractament de la mostra que repercuteix en la qualitat del resultat final, a més d'allargar el temps d'anàlisi global.

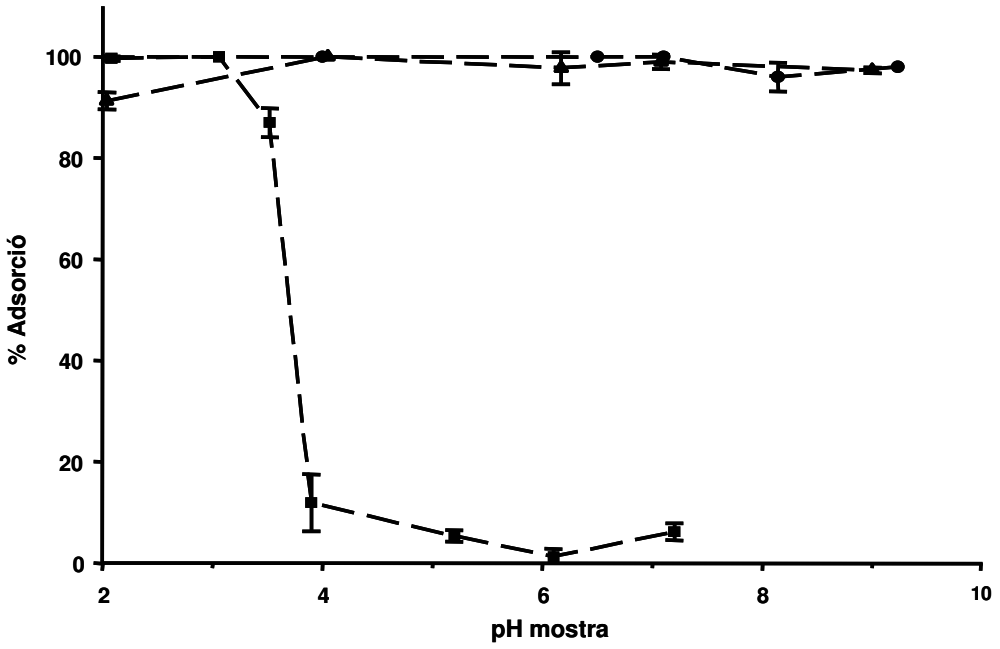


Figura 3.5. Efecte del pH de la mostra en els percentatges de recuperació per a l'herbicida 2,4-D retingut per diferents adsorbents (■ ODS-C_{18}, ● SDB-1, ▲ XAD-2). Condicions experimentals iguals a la Taula 3.1.

Els adsorbents de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB) són més eficients en la retenció dels herbicides acídics polars que els adsorbents de sílica [39,49]. Adsorbents de PS-DVB han estat utilitzats a pH neutre amb recuperacions per als herbicides acídics similars a les obtingudes a valors de pH àcid amb els adsorbents de sílica, sense cap mena de retenció de les substàncies húmiques i fúlviques coextretes [39]. Com es pot veure a la **Figura 3.5**, la retenció de l'herbicida 2,4-D és quantitativa fins a valors de pH de 9.5 amb els dos tipus d'adsorbents de PS-DVB avaluats en aquest estudi. Valors de pH més elevats de 9.5 no han estat assajats ja que el pH de les mostres després de l'extracció alcalina és sempre ≤ 9.5. Aquest comportament és degut al fet que el mecanisme primari d'adsorció per als adsorbents de PS-DVB és via interaccions π-π amb els anells aromàtics dels anàlits [39,50], i no és necessari tenir la forma protonada de l'anàlit per a la seva adsorció quantitativa.

La disminució en la retenció de l'herbicida amb la resina XAD-2 a pH = 2 és deguda a que les substàncies húmiques i fúlviques no es troben ionitzades a aquest pH i poden ser retingudes més efectivament pels sorbents de PS-DVB (aquest fet es va poder comprovar experimentalment per la coloració marronosa que va aparèixer als adsorbents quan es van processar les mostres amb aquest pH). La gran quantitat de substàncies húmiques i fúlviques presents als extractes de sòl pot donar lloc a la ràpida saturació dels adsorbents amb capacitats més baixes, comportant retencions baixes dels anàlits d'interès, com és el cas de la resina XAD-2 degut a la seva baixa àrea superficial (330 $m^2 \cdot g^{-1}$ per a la resina XAD-2 i 933 $m^2 \cdot g^{-1}$ per al cartutx SDB-1).

Pichon et al. [39] suggereixen que els adsorbents de PS-DVB no retenen les substàncies húmiques i fúlviques quan les mostres tenen valors neutres de pH. Els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que aquest comportament succeeix en un interval més ample (pH 4 a 9.5).

Per a l'estudi de la resina XAD-2, aquesta es va ubicar en una columna de vidre de 10 mm i.d. a diferentes alçades de llit. Els resultats obtinguts mostren que és necessària una alçada de llit de 40 mm (1440-1450 mg de reïna) per obtenir recuperacions quantitatives (**Figura 3.5**). Alçades de llit inferiors donen lloc a recuperacions menors (89% per a una alçada de 20 mm i 50 % per a una alçada de 10 mm). Aquest fet es pot atribuir a la menor àrea superficial de la resina XAD-2 que fa necessari l'ús de majors quantitats de sorbent per obtenir resultats similars als del cartutx SDB-1 (200 mg de sorbent).

Els factors de capacitat dels adsorbents avaluats mostren que els adsorbents de PS-DVB són més eficients per retenir quantitativament l'herbicida acídic 2,4-D sense la necessitat d'ajustar prèviament el pH dels extractes. No obstant, els anàlits poden ser fortament retinguts en la superfície de l'adsorbent i poden presentar una elució difícil. Com que el principal objectiu d'aquest estudi és determinar el contingut dels anàlits en sòls, els compostos han de ser eluïts quantitativament de l'adsorbent per mesurar-los amb el mètode d'IP-HPLC. Per tant, la determinació dels percentatges de recuperació del 2,4-D (calculats a partir del contingut en l'extracte alcalí fortificat) són més útils que els paràmetres de retenció avaluats prèviament. La **Figura 3.6** mostra els percentatges de recuperació per al 2,4-D obtinguts per a l'adsorbent SDB-1. Com es pot veure, el cartutx SDB-1 permet la recuperació quantitativa de l'anàlit a valors de pH des de 4 fins a 9.5. La saturació del cartutx a pH = 2 per les substàncies húmiques i fúlviques explica les recuperacions inferiors i l'alta variabilitat de les dades en aquest pH. Després de

l'elució dels anàlits a pH = 2, el sorbent encara conserva coloració marró que indica que algunes substàncies húmiques i fúlviques es troben retingudes. Alguna porció dels anàlits d'interès pot quedar fortament retingut amb aquestes substàncies donant lloc a recuperacions no quantitatives en aquestes condicions i fent que siguin necessaris volums d'elució superiors. La resina de poliestirè-divinilbenzè XAD-2 només és efectiva a valors de pH bàsics. Al voltant d'un 80 % de l'anàlit inicial és recuperat a pH = 8, mentre que a pH = 9.5 s'obtenen recuperacions inferiors al 70 %.

Aquests resultats indiquen que l'adsorbent SDB-1 és la millor opció per a la concentració quantitativa de l'herbicida 2,4-D quan és extret de les mostres de sòl amb hidròxid sòdic 0.01 M. Amb aquest adsorbent, no és necessari ajustar el pH de la mostra abans de l'etapa de concentració i "*clean-up*".

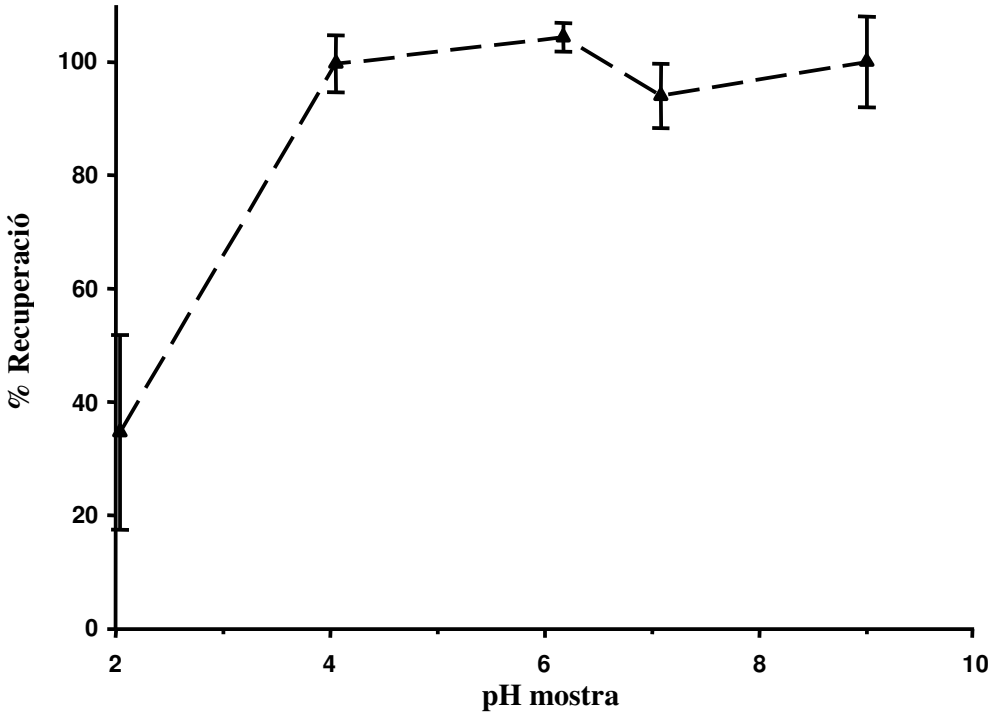


Figura 3.6. Estudi de les recuperacions per a l'herbicida 2,4-D a diferents valors de pH (cartutx SDB-1). Condicions experimentals igual a la Taula 3.1.

La **Taula 3.2** mostra els resultats obtinguts en les recuperacions dels herbicides fenoxiacètics (2,4-D i MCPA) i tots els seus metabòlits utilitzant el procediment

desenvolupat per a l'herbicida 2,4-D. Com es pot observar, tots els anàlits són recuperats quantitativament utilitzant el cartutx SDB-1. Els resultats mostren que aquest cartutx pot ser utilitzat per retenir els anàlits al pH que resulta de l'extracció alcalina de les mostres de sòl sense necessitat d'ajustar-ho, el que sí és necessari quan s'utilitzen cartutxos de sílica convencional. Les substàncies húmiques i fúlviques, que estan presents en grans quantitats en els extractes, no són retinguts eficientment pel cartutx SDB-1 quan els extractes es passen a través del cartutx a valors de pH neutres i alcalins.

Taula 3.2. Recuperacions (%) obtingudes per als herbicides fenoxiacètics (2,4-D i MCPA) i els seus derivats fenòlics utilitzant el cartutx SDB-1. Condicions experimentals: extractes de sòl amb NaOH 0.01 M, fortificats a nivell 1 $mg \cdot L^{-1}$, flux de càrrega = 0.5 $mL \cdot min^{-1}$, volum d'elució = 5 mL, 3 replicats de cada anàlit.

Anàlit	MeOH
MCPA	95 ± 5
2,4-D	96 ± 4
2-MP	101 ± 3
2-CP	93 ± 6
4-CP	97 ± 9
2,4-DCP	105 ± 6
4-C-2-MP	99 ± 11
2,4,5-TCP	101 ± 5

3.3.3. INFLUÈNCIA DE LA VELOCITAT DE FLUX DE LA MOSTRA

La velocitat de flux durant l'etapa de d'adsorció és un paràmetre important a ser avaluat ja que els herbicides fenoxiacètics i els seus derivats fenòlics estan desprotonats al pH alcalí dels extractes. Estudis previs han demostrat que els herbicides acídics poden ser retinguts quantitativament en diferents adsorbents a velocitats de flux fins a 10 $mL \cdot min^{-1}$ (e.g. Carbopack B i SAX [52], sílica enllaçada amb C_{18} [53,54], resina XAD-2 [55], i cartutxos de poliestirè [33,39]). En molts estudis, la mostra és acidificada abans de ser carregada o transferida en el cartutx per protonar tots els anàlits. Pichon et al. [39] van avaluar l'extracció d'alguns herbicides acídics polars amb el cartutx SDB-1 a pH neutre i a una velocitat de flux en la retenció dels anàlits de 10 $mL \cdot min^{-1}$, obtenint una recuperació quantitativa dels anàlits. Luque-García et al. [56] van trobar una velocitat de flux òptima entre 0.5-0.7 $mL \cdot min^{-1}$ per a la retenció d'un grup d'àcids fenoxiacètics (inclòs el 2,4-D) utilitzant una minicolumna farcida d'adsorbent C_{18}-Hydra. Un augment en la velocitat de flux va donar lloc a una disminució en els nivells de retenció.

La **Figura 3.7** mostra les recuperacions obtingudes per als herbicides 2,4-D, MCPA i per a 4-CP, com a anàlit representatiu del grup dels clorofenols, a diferents velocitats de flux durant l'etapa de càrrega de la mostra a pH alcalí. La recuperació de 4-CP no queda afectada per la velocitat de flux durant la càrrega de la mostra en el cartutx i s'obtenen recuperacions quantitatives per velocitats de flux fins a 30 $mL \cdot min^{-1}$. Les recuperacions dels herbicides àcids fenoxiacètics, no obstant, queden afectats per la velocitat de flux de càrrega de la mostra. 2,4-D i MCPA poden ser recuperats quantitativament quan la mostra es carrega a 0.5 $mL \cdot min^{-1}$, però les seves recuperacions disminueixen a fluxos de càrrega superiors. Aquest fet pot ser explicat per l'elevada polaritat d'aquests herbicides, fent necessari augmentar el temps de contacte entre l'anàlit i l'adsorbent de poliestirè a pH alcalí per permetre les interaccions π-π que són les que fan possible que els anàlits quedin retinguts en l'adsorbent. Un augment de la velocitat de flux resulta en un temps de contacte inferior i la cinètica de retenció no és l'adequada per aconseguir una adsorció quantitativa dels anàlits.

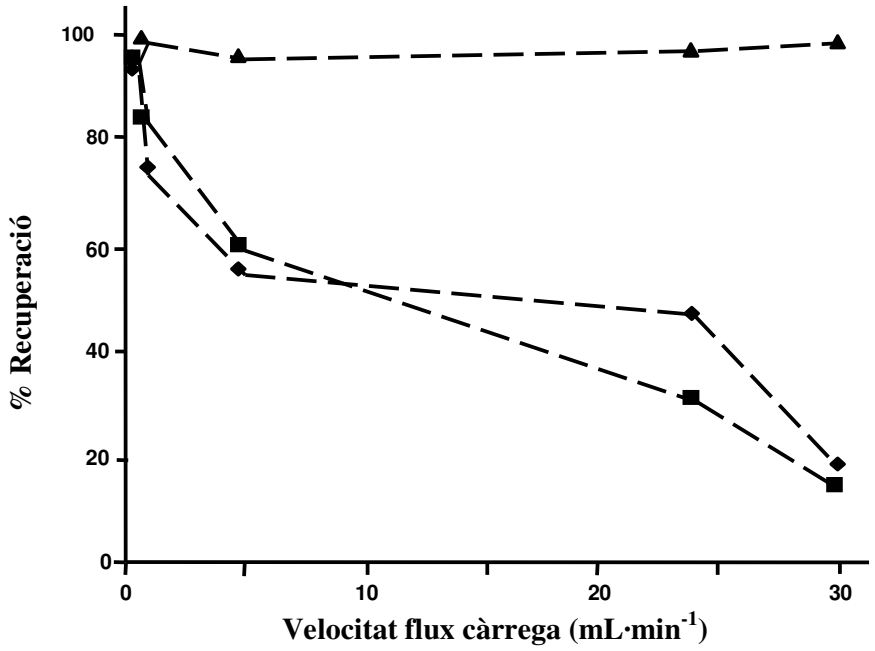


Figura 3.7. Efecte de la velocitat de flux de la mostra en les recuperacions de 2,4-D, MCPA i 4-CP. Condicions experimentals iguals a la Taula 3.1.

3.3.4. ESTUDI DE LES VARIABLES D'ELUCIÓ

3.3.4.1. Dissolvent d'elució

El dissolvent utilitzat per a la desorció dels anàlits dels cartutxs ha de ser compatible amb la fase mòbil utilitzada en la determinació per IP-HPLC si no es volen introduir etapes addicionals en el tractament de la mostra. El paràmetre limitant en la determinació per IP-HPLC dels anàlits és la separació del parell 2,4-D i MCPA. Com ja s'ha vist en el capítol anterior, la resolució per aquest parell de compostos és altament depenent del contingut de metanol present en la dissolució a ser injectada, obtenint-se separacions a la línia base (R_S = 2.0) en aigua al 100 %, però la resolució disminueix a 1.8 en 50:50 metanol:aigua i a 1.4 en 60:40 metanol:aigua. Com es pot veure a la **Figura 3.8**, l'augment en el contingut de metanol a la dissolució injectada provoca un augment en l'amplada de pic del 2,4-D.

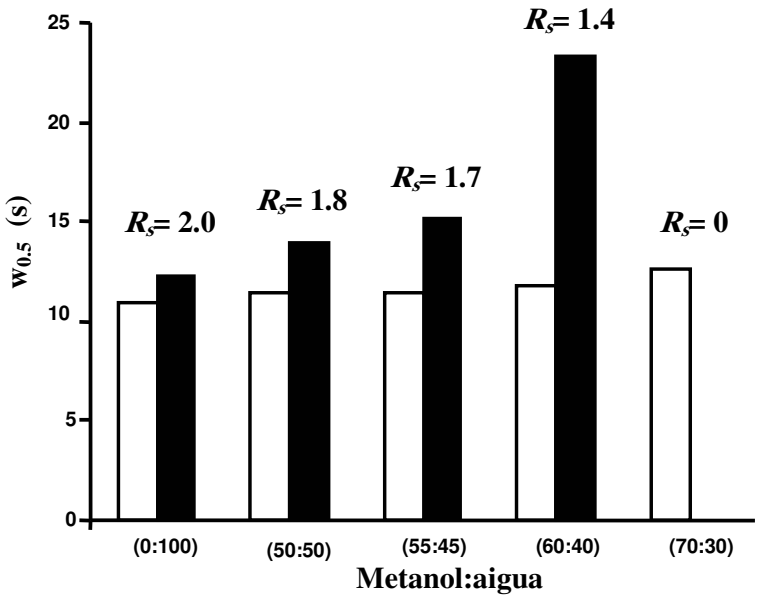


Figura 3.8. Amplada de pic a mitja alçada per al MCPA (columnes blanques) i 2,4-D (columnes negres) a diferents barreges metanol:aigua en la dissolució utilitzada per eluir els anàlits de l'adsorbent. R_S mostra els valors de resolució obtinguts per a cada composició de dissolvents.

Un contingut de metanol més alt o igual a 70 % provoca un pic massa ample per al 2,4-D que fa impossible la seva separació del MCPA per a l'anàlisi quantitativa en barreges dels anàlits. És necessari eluir el 2,4-D i MCPA del cartutx SDB-1 amb una dissolució que contingui menys de 60% de metanol per poder determinar aquests dos compostos en les mostres. Els resultats obtinguts mostren que una elució amb una dissolució de metanol:aigua (50:50) proporciona una recuperació quantitativa per al 2,4-D (106±7 %) i MCPA (103±3 %), que són els compostos més polars. El 2-CP i 4-CP els quals són solubles en aigua, també són eluïts en aquestes condicions però les recuperacions són inferiors al 100 %. El 2-CP s'elueix en un percentatge superior al 90 % i el 4-CP només és eluït parcialment (entre 3-40 % depenent de la quantitat d'anàlit retingut). Els altres metabòlits (2-MP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) no són eluïts de l'adsorbent amb aquesta barreja i requereixen una segona elució amb metanol 100 %. Això significa que una sèrie de dos dissolucions d'elució són necessàries per aconseguir la determinació de tots els compostos. No obstant, una elució simple amb 50:50 metanol:aigua pot ser realitzada si només es requereix la determinació de 2,4-D i MCPA. El major inconvenient del mètode proposat és la distribució variable del 4-CP

entre les dues solucions d'elució que dóna lloc a un límit de detecció superior per a aquest compost ja que ha de ser determinat a les dues fraccions. Afortunadament, la sensibilitat del mètode IP-HPLC per al 4-CP és superior que per als altres compostos i el límit de detecció del mètode proposat en sòls (**Taula 3.3**) es troba en l'interval dels $\mu g \cdot kg^{-1}$. Aquest problema es pot solucionar emprant un mètode HPLC diferent que permeti l'anàlisi directe de tots els anàlits en metanol 100 %.

3.3.4.2. Determinació del volum d'elució

Els resultats obtinguts en l'estudi del volum d'elució requerit per a l'elució quantitativa de tots els anàlits es mostren a la **Figura 3.9.** En la primera fracció, eluïda amb metanol:aigua (50:50), es requereixen 5 mL per a una recuperació quantitativa de 2,4-D i MCPA per un volum de mostra de 25 mL que conté 25 µg de cada compost. La segona fracció, eluïda amb metanol, requereix 4 mL per a la recuperació quantitativa de 2-MP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP, així com 2-CP i 4-CP restants.

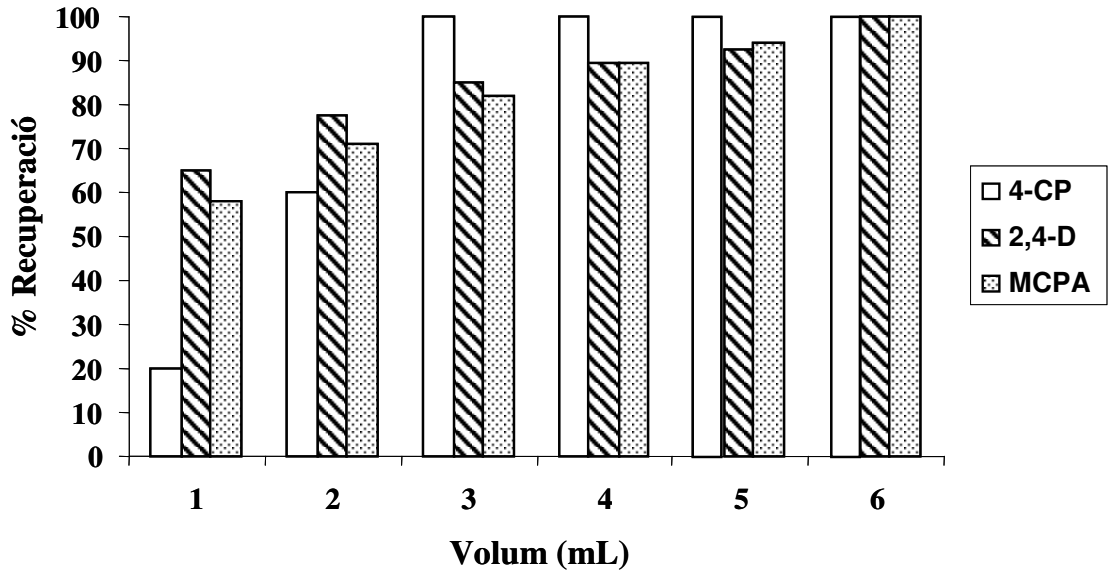


Figura 3.9. Percentatges de recuperació per a 2,4-D, MCPA i 4-CP eluïts amb diferents volums. Solucions d'elució: MeOH:aigua (50:50) per a 2,4-D i MCPA i MeOH 100 % per a 4-CP.

La **Figura 3.10** mostra els cromatogrames obtinguts en l'anàlisi d'un sòl fortificat amb els set anàlits a 1 $mg \cdot kg^{-1}$ (utilitzant la metodologia de "*spot spiking*"

explicada en l'apartat experimental). La **Figura 3.10 a** mostra el cromatograma obtingut per a la primera fracció eluïda amb 5 mL de metanol:aigua (50:50). La línia discontínua correspon a un blanc del mateix sòl sense fortificar i analitzat seguint el mateix procediment que la mostra fortificada. Com s'ha indicat abans, 2,4-D, MCPA i 2-CP poden ser determinats i quantificats en aquesta fracció. La **Figura 3.10 b** correspon a la segona fracció eluïda amb 4 mL de metanol. Els anàlits 2-MP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP són eluïts quantitativament en aquesta fracció. La quantificació de 4-CP és possible amb la determinació del contingut trobat tant en la primera com en la segona fracció.

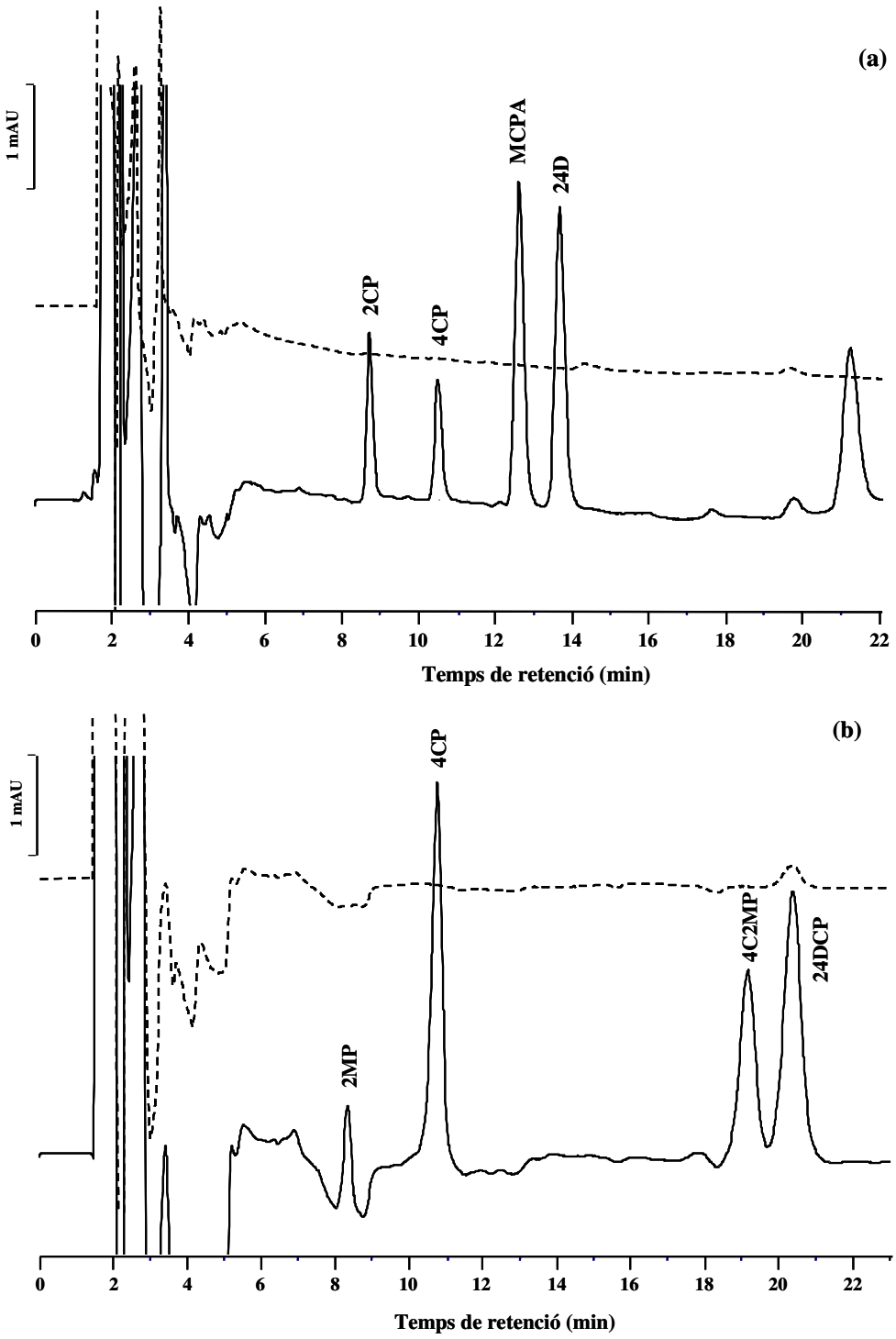


Figura 3.10. Cromatogrames obtinguts per una mostra de sòl fortificada a nivell de 1 mg·kg^{-1}: **(a)** primera fracció eluïda del cartutx SDB-1 amb 5 mL de metanol:aigua (50:50); **(b)** segona fracció eluïda amb 4 mL de metanol. Les línies discontínues corresponen a blancs de les mostres de sòl sense fortificar seguint el mateix procediment que les mostres de sòl fortificades (veure l'apartat experimental el mètode de "*spot spiking*").

3.3.5. VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC DESENVOLUPAT

El procediment "*spot spiking*" es va utilitzar per a la validació del mètode complert. El comportament del mètode es va determinar processant les dades obtingudes a tres nivells de concentració de mostres fortificades. Els resultats es mostren a la **Taula 3.3.** Les desviacions estàndard relatives (RSD) en les recuperacions dels anàlits de tres replicats van ser inferiors al 4 % per pràcticament tots els anàlits i concentracions avaluades. L'anàlisi estadística de les dades de recuperació mostren que no hi ha diferències significatives en els valors obtinguts als tres nivells de concentració (P=0.74).

Taula 3.3. Límits de detecció (LD) dels anàlits en sòls fortificats i recuperacions (%) obtingudes a diferents nivells de mostres de sòls fortificades (n = 3).
Els valors entre parèntesi indiquen les desviacions estàndard relatives (RSD) obtingudes. Les mostres de sòl es van fortificar utilitzant el mètode "*spot spiking*" descrit a la secció Experimental.

Anàlit	**Recuperació (%)**			**LD**
	1 mg·kg^{-1}	**10 mg·kg^{-1}**	**100 mg·kg^{-1}**	**(μg·kg^{-1})**
MCPA	107 (2.0)	105 (1.6)	104 (0.8)	5
2,4-D	104 (2.0)	102 (2.0)	100 (0.8)	10
2-CP	95 (3.6)	96 (2.4)	99 (0.8)	10
4-CP	95 (0.4)	95 (2.4)	98 (1.6)	5
2-MP	100 (2.0)	101 (2.4)	98 (1.6)	3
4-C-2-MP	105 (3.6)	102 (7.6)	104 (0.8)	3
2,4-DCP	100 (0.8)	103 (0.9)	101 (1.2)	10

La **Taula 3.3** també mostra els límits de detecció del mètode proposat determinats experimentalment. Aquests valors van ser determinats fortificant porcions de sòl a diferents nivells. Els límits de detecció indicats a la **Taula 3.3** es corresponen als valors de fortificació que van donar lloc a relacions senyal/soroll lleugerament superiors a 3 en els cromatogrames resultants.

L'agència per a la protecció del medi ambient dels Estats Units ("*Environmental Protection Agency*", EPA) proposa el mètode 8151A per a la determinació de 2,4-D, MCPA i altres herbicides acídics clorats en sòls i matrius de residus. Aquest mètode s'ha utilitzat per validar el proposat en aquest estudi. Les mostres de sòl es varen fortificar com suggereix el mètode EPA. Aquest mètode contempla dos procediments d'extracció i es va optar per realitzar l'extracció amb ultrasons utilitzant clorur de metilè/acetona (1:1; v/v) com a solvent. Els resultats mostren que les recuperacions obtingudes amb el mètode proposat en aquest estudi (94 % per al MCPA i 98 % per al 2,4-D, n=4) són significativament superiors ($P<0.05$) als resultats obtinguts amb el mètode EPA (54 % per al MCPA i 56 % per al 2,4-D, n=3). Com es pot comprovar, no hi ha pèrdua d'anàlits amb el mètode proposat en aquest estudi, mentre que amb el mètode de referència només es recupera entre un 54-56 % dels analits.

3.3.6. ANÀLISI DE MOSTRES REALS

El mètode desenvolupat ha estat aplicat en l'anàlisi de mostres de sòls d'un camp de golf on s'ha tractat la gespa amb Bi-Hedonal®, un producte comercial que conté 2,4-D i MCPA en forma de sals d'amina. Les mostres han estat agafades a diferents profunditats i a diferents intervals de temps després de l'aplicació del producte comercial per avaluar la persistència dels herbicides i seguir la formació dels seus principals productes de degradació. Posteriorment, al **Capítol 5**, es mostraran tots els resultats obtinguts a l'estudi de camp, així com la seva discussió. No obstant, s'inclou en aquest capítol un exemple (**Figura 3.11**) que mostra els cromatogrames obtinguts per a l'anàlisi d'una mostra de sòl corresponent al novè dia d'aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal®. Les línies contínues mostren els cromatogrames obtinguts després de la concentració i "*clean-up*" d'extractes amb el cartutx SDB-1, mentre que les línies en discontinu mostren el cromatograma de les mateixes mostres abans de ser passades pel cartutx SDB-1. Com es pot observar, l'eficàcia del cartutx SDB-1 permet eliminar la major porció de les substàncies húmiques i fúlviques alhora que concentra els anàlits.

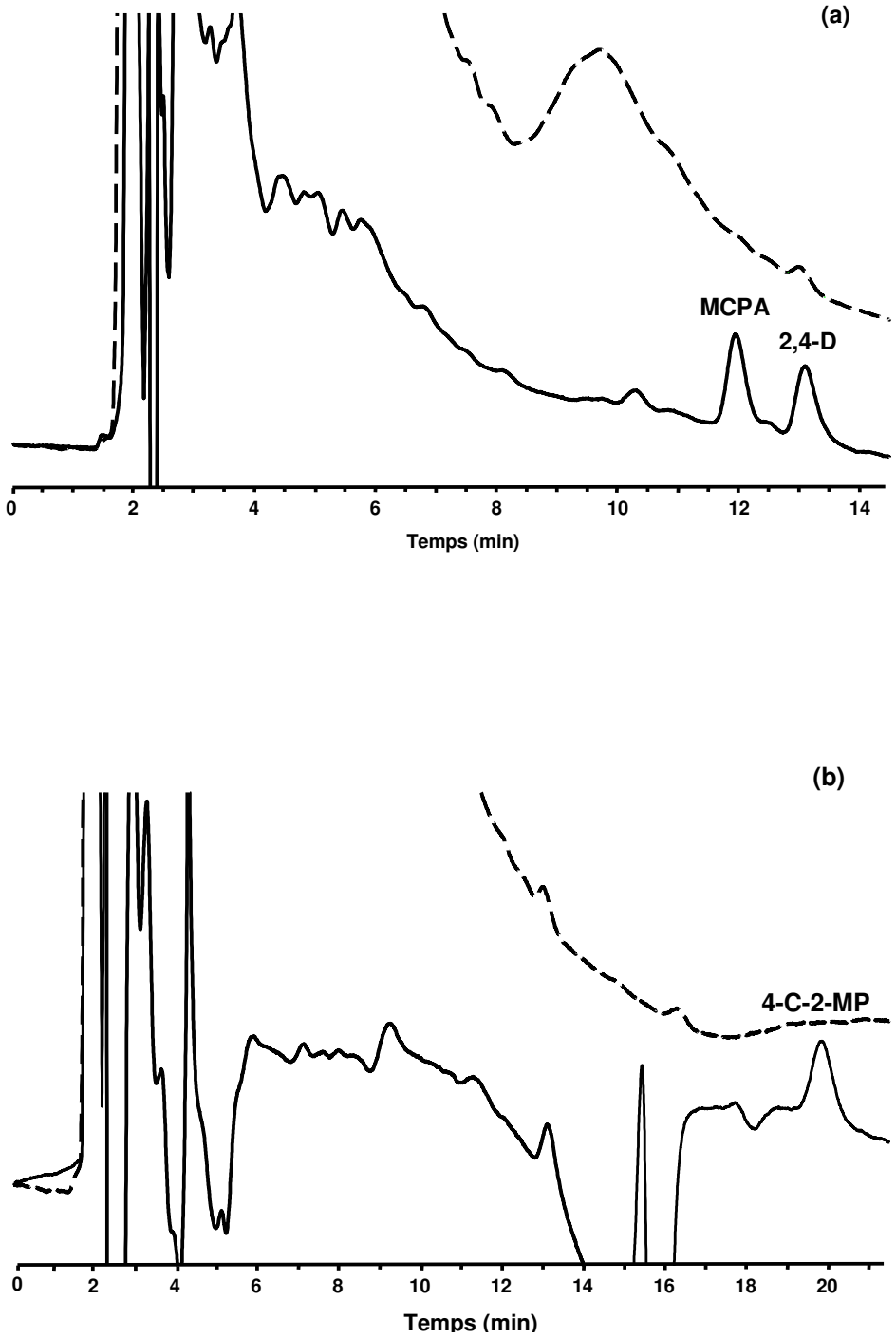


Figura 3.11. Cromatogrames obtinguts per una mostra de sòl del novè dia després de l'aplicació de l'herbicida comercial. Les línies contínues mostren els cromatogrames obtinguts després del "*clean-up*" i concentració amb el cartutx SDB-1. Les línies discontínues mostren els cromatogrames obtinguts per a les mateixes mostres, però abans de ser passades a través del cartutx SDB-1. (a) Primera fracció eluïda amb MeOH:aigua (50:50), (b) segona fracció eluïda amb metanol 100%.

3.4. REFERÈNCIES

1. E.M. Thurman, M.S. Mills, "Solid-phase extraction. Principles and practice", John Wiley & Sons, Nova York, NY (USA), 1998, ISBN 0-471-61422-X.
2. V. Pichon, M.C. Hennion, Environ. Sci. Technol., 28 (1994), 576.
3. M.C. Hennion, J. Chromatogr. A, 856 (1999), 3.
4. J.S. Fritz, "Analytical Solid-Phase Extraction", John Willey & Sons, Nova York, NY (USA), 1999, ISBN 0-471-24667-0.
5. K. Dorfner, en "Ion Exchangers", K. Dorfner (ed.), Walter de Gruyter, Berlin (Alemania), 1991, ISBN: 3-11-010341-9.
6. E.M. Thurman, K. Snavely, Trends Anal. Chem., 19 (2000), 18.
7. M.T. Galcerán, O. Jáuregui, Anal. Chim. Acta, 304 (1995), 75.
8. M.B. Riley, R.J. Keese, Weed Sci., 44 (1996), 689.
9. E. Viana, M.J. Redondo, G. Font, J.C. Moltó, J. Chromatogr. A, 733 (1996), 267.
10. I. Liska, J. Chromatogr. A, 655 (1993), 163.
11. E.R. Brouwer, D.J. van Iperen, I. Liska, H. Lingeman, U.A. Th. Brinkman, Int. J. Environ. Anal. Chem., 47 (1992), 257.
12. C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 754 (1996), 77.
13. M-C. Heenion, P. Scribe, en "Environmental Analysis. Techniques, Applications and Quality Assurance", Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry Series, Vol. 13, D. Barceló (Ed.), Elsevier, Amsterdam (Holanda), 1993, ISBN: 0-444-89648-1.
14. R.M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull, U.A. Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 696 (1995), 63.
15. D. Puig, D. Barceló, Trends Anal. Chem., 15 (1996), 362.
16. R. Sasano, T. Hamada, M. Furuno, J. Chromatogr. A, 896 (2000), 41.
17. R.J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M. Noij, J. Chromatogr. A, 794 (1998), 187.
18. J.L. Bernal, M.J. Nozal, L. Toribio, M.L. Serna, F. Borrull, R.M. Marcè, E. Pocurull, J. Chromatogr. A, 778 (1997), 321.
19. J. Hernández-Borges, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, M.A. Rodríguez-Delgado, J. Chromatogr. A, 1070 (2005), 171.
20. S. Ollers, M. Van Lieshout, H-G. Janssen, C.A. Cramers, LC-GC Int., 10 (1997), 435.
21. E. Pocurull, C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 818 (1998), 85.
22. A.J.H. Louter, P.A. Jones, J.D. Jorritsma, J.J. Vreuls, U.A. Th. Brinkman, J. High Resol. Chromatogr., 20 (1997), 363.
23. T. Hyötyläinen, K-. Grob, M. Biedermann, M-L. Riekkola, J. High Resol. Chromatogr., 20 (1997), 410.
24. J.R. Veraart, C. Gooijer, H. Lingeman, N.H. Velthorst, U.A. Th. Brinkman, Chromatographia, 44 (1997), 581.
25. J. Slobodník, Ö. Öztezkizan, H. Lingeman, U.A. Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 750 (1996), 227.

26. P. Önnerfjord, D. Barceló, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, J. Chromatogr. A, 737 (1996), 35.
27. A. Duinkerken, A. Schellen, O. Halmingh, M. Van Gils, B. Ooms, LC-GC Europe, 13 (2000), 182.
28. T. Renner, D. Baumgarten, K.K. Unger, Chromatographia, 45 (1997), 199.
29. E.A. Hogendoorn, R. Hoogerbrugge, R.A. Baumann, H.D. Meiring, A.P.J.M. de Jong, P. Van Zoonen, J. Chromatogr. A, 754 (1996), 49.
30. E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, B. Baumann, C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernández, Anal. Chem., 71 (1999), 1111.
31. E.A. Hogendoorn, P. Van Zoonen, J. Chromatogr. A 703 (1995), 149.
32. O. Jáuregui, M.T. Galceran, Anal. Chim. Acta, 340 (1997), 191.
33. D. Puig, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 733 (1996), 371.
34. P. Bonifazi, A.R. Mastrogiacomo, E. Pierini, F. Bruner, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 57 (1994), 21.
35. P. Bonifazi, E. Pierini, F. Bruner, Chromatographia, 44 (1997), 595.
36. N. Masqué, R.M. Marcé, F.Borrull, Chromatographia, 48 (1998), 231.
37. K-S. Boos, A. Rudolphi, LG-GC Int., 11 (1998), 84.
38. K-S. Boos, C-H. Grimm, Trends Anal. Chem., 18 (1999), 175.
39. V. Pichon, C. Cau Dit Coumes, L. Chen, S. Guenu, M-C. Hennion, J. Chromatogr. A, 737 (1996), 25.
40. R.B. Geerdink, S. Van Tol-Wildenburg, W.M.A. Niessen, U.A. Th. Brinkman, Analyst, 122 (1997), 889.
41. I. Ferrer, D. Barceló, E.M. Thurman, Anal. Chem., 71 (1999), 1009.
42. R.B. Geerdink, A. Attema, W.M.A. Niessen, U.A. Th. Brinkman, LC-GC Int., 11 (1998), 361.
43. A.C. Hogenboom, I. Jagt, R.J.J. Vreuls, U.A. Th. Brinkman, Analyst, 122 (1997), 1371.
44. L.E. Vera-Avila, J. Reza, R. Covarrubias, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 63 (1996), 301.
45. A. Baun, N. Nyholm, Wat. Sci. Tech. 33 (1996), 339.
46. W. Thorstensen, A. Christiansen, J. Agric. Food Chem., 49 (2001), 4199.
47. J. Frebortova, Biosci. Biotech. Biochem., 59 (1995), 1930.
48. G. Sirvent, "Desenvolupament de mètodes de determinació de compostos fenòlics en aigües i sòls. Caracterització dels processos d'adsorció en diferents tipus de sòls" (tesi doctoral), Universitat de Girona (2005).
49. M.J.M. Wells, L.Z. Yu, J. Chromatogr. A, 885 (2000), 237.
50. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, Trends Anal. Chem., 17 (1998), 384.
51. A. Balinova, J. Chromatogr., 643 (1993), 203.
52. A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi, Anal. Chem., 61 (1989), 1363.
53. W.K. Wang, S.D. Huang, J. Chromatogr. A, 483 (1999), 121.
54. A. Balinova, J. Chromatogr. A, 728 (1996), 319
55. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcárcel, Environ. Sci. Technol., 35 (2001), 4265.
56. J.L. Luque-García, S. Morales-Muñoz, M.D. Luque de Castro, Chromatographia, 55 (2002), 117

CAPÍTOL 4

DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA DE MEMBRANA LÍQUIDA "*ON-LINE*" A HPLC PER A LA CONCENTRACIÓ I "*CLEAN-UP*" DE 2,4-D, MCPA I METABÒLITS FENÒLICS EN EXTRACTES DE SÒLS

CONTINGUTS CAPÍTOL 4:

4.1. INTRODUCCIÓ.....122

4.1.1. MEMBRANES LÍQUIDES SUPORTADES (SLM).....122
4.1.1.1. Avantatges i limitacions de les SLM.....123
4.1.1.2. Aplicacions de les membranes líquides suportades.....124

4.2. EXPERIMENTAL.....128

4.2.1. REACTIUS.....128
4.2.2. DISSOLUCIONS.....129
4.2.3. APARELLS I MATERIALS.....129
4.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL.....130
4.2.4.1. Determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics.....130
4.2.4.2. Experiments amb membrana líquida suportada.....130
4.2.4.2.1. Membranes laminars.....131
4.2.4.2.2. Fibra buida ("*hollow fiber*").....132
4.2.4.2.3. Sistema "*on-line*" (HFSLM-HPLC).....133

4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....135

4.3.1. DISSENY DEL SISTEMA DE MEMBRANA LÍQUIDA.....135
4.3.1.1. Dissolvent orgànic.....136
4.3.1.2. Temps d'operació.....137
4.3.2. EXPERIMENTS DE PRECONCENTRACIÓ.....138
4.3.2.1. Anàlisi de mostres de sòls.....140
4.3.3. COMPARACIÓ DE RESULTATS DE SPE I SLM.....144

4.4. REFERÈNCIES.....146

4.1. INTRODUCCIÓ

La determinació directa dels dos herbicides fenoxiacètics estudiats en aquesta tesi i els seus metabòlits fenòlics a nivells traça en mostres medioambientals és complexa ja que la major part dels mètodes actuals careixen de la sensibilitat i selectivitat adequades. Particularment, quan s'aplica la cromatografia líquida amb detecció UV-Visible per a l'anàlisi de sòls la coextracció de substàncies húmiques i fúlviques comporta problemes de quantificació dels compostos menys retinguts per la columna cromatogràfica. Per solucionar aquests problemes és necessari desenvolupar etapes de tractament de la mostra, concentració i "*clean-up*", abans de la determinació de 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits per HPLC-UV.

S'han publicat mètodes relacionats amb l'extracció dels herbicides fenoxiacètics en sòls utilitzant tècniques com extracció sòlid-líquid (SLE) [1], extracció en fase sòlida (SPE) [2], extracció amb fluid supercrític (SFE) [3] i extracció assistida per microones (MAE) [4]. Una alternativa a aquests mètodes de concentració és la utilització de membranes líquides suportades (SLM) per concentrar els compostos orgànics dels extractes de sòls. Les SLM es poden utilitzar per a extraccions selectives i concentracions eficients de varis tipus d'anàlits [5]. A més, aquesta metodologia permet aconseguir factors de concentració elevats i es pot acoblar fàcilment "*on-line*" a sistemes cromatogràfics [5-7]. Les SLM han estat aplicades a la separació i concentració de plaguicides, com herbicides derivats de la sulfonilurea [8], triazines [9-13], fenols [14] i herbicides acídics [15,16]. Han estat desenvolupats nous procediments automatitzats utilitzant membranes microporoses basades en l'extracció líquid-líquid (MMLLE), tècnica relacionada amb les membranes líquides i basada en l'extracció líquid-líquid, per determinar compostos acídics [17].

4.1.1. MEMBRANES LÍQUIDES SUPORTADES (SLM)

Com ja s'ha indicat en el **Capítol 1** un sistema de membrana líquida pot estar constituït per una dissolució orgànica separant dues fases aquoses. En el cas de les membranes líquides suportades la fase orgànica es troba retinguda en els porus d'un suport sòlid. El transport dels anàlits des de la fase de càrrega fins a la fase receptora depèn de diversos factors que inclouen paràmetres físics i químics [18]. En el primer cas

els paràmetres implicats són la velocitat d'agitació de les dues fases, l'àrea de contacte de la membrana líquida suportada i la seva geometria. Pel que fa als paràmetres químics, es poden diferenciar els de les dues dissolucions aquoses i els de la fase membrana. En el cas de les fases aquoses pot afectar el pH, la presència d'un tampó, el tipus de solut i la seva concentració i la força iònica En el cas de la fase membrana, influeixen el tipus d'extractant (si és necessària la seva presència), la seva concentració, el dissolvent orgànic, el modificador i el suport emprat.

Els dissolvents orgànics més utilitzats són els hidrocarburs de cadena llarga, com l'undecà, el dodecà o el querosè, i compostos més polars com l'éter dihexílic o el fosfat de dioctil. Cal tenir en compte que el dissolvent orgànic influeix de manera important tant en l'estabilitat de la membrana com en la permeació del solut. En molts casos cal utilitzar modificadors (e.g. alcohols com 1-dodecanol) que milloren les propietats de la fase orgànica augmentant la solubilitat de l'extractant o variant les propietats interfacials [19].

Pel que fa al suport, és un film sòlid polimèric de polipropilè, polisulfona, politetrafluoretilè o altres materials hidrofòbics amb mida de porus que oscil·la entre 0.02-1 μm [6]. Les característiques que hauria de tenir un bon suport polimèric són: elevada porositat, mida de porus petita, no ser gaire gruixut, resistència química, hidrofobicitat i baix cost [20].

En dissenyar un sistema de SLM cal tenir en compte la influència de tots els paràmetres esmentats, tant els físics com els químics.

4.1.1.1. Avantatges i limitacions de les SLM

Els principals avantatges que presenten les membranes líquides suportades es poden resumir en [6]:

- Ús reduït de dissolvents orgànics (i.e. risc de contaminació mínim).
- L'extracció i recuperació de l'analit té lloc en una única etapa.
- Fàcil automatització i connexió "*on-line*" amb un instrument analític.
- Valors de concentració elevats. Es poden tractar litres de mostra i concentrar en un volum inferior a 1 mL.
- Baixos costos de capital i d'operació, i baix consum energètic.

- Es poden fer servir extractants de preu elevat ja que s'utilitzen quantitats petites.
- Presenten elevada selectivitat i són aptes per a processos de purificació. En algunes aplicacions, s'ha demostrat que es poden separar els anàlits de substàncies interferents, com àcids húmics, presents a la mostra [11].

Els principals inconvenients són:

- L'estabilitat de la membrana és limitada a causa de les diferències de pressió existents i de pèrdues de dissolució orgànica per solubilització en les fases aquoses.
- Els temps d'extracció són més llargs que en el cas d'aplicar LLE o SPE. Per això, quan s'apliquen a la determinació de plaguicides cal assegurar-se que no es degradin durant el procés.

SLM combina la selectivitat i concentració de la LLE amb l'eficiència en l'eliminació d'interferències de la matriu. En un procés de membrana líquida es combinen les etapes d'extracció i retroextracció en un sol pas. Si es compara amb SPE, SLM evita o redueix els problemes de saturació, trencament, sorció competitiva, especificitat i contaminació. A més, la quantitat de dissolvent orgànic que s'utilitza és inferior.

4.1.1.2. Aplicacions de les membranes líquides suportades

Des de la seva aparició, les membranes líquides s'han aplicat en camps molt variats, com mostren les diferents revisions que s'han fet [6,13,16,18-21]. Un camp d'aplicació important és la separació de metalls, tal com es pot veure en la revisió de Gyves et al. [21]. La tècnica s'ha aplicat per a metalls tan diversos com Cu, Ni, Cd, Co, Zn [22], metalls del grup del platí (Rh, Pd i Pt) [23], Eu i Am [6]. També cal destacar el camp de les aplicacions mèdiques; bàsicament s'han utilitzat les membranes en la determinació de drogues i d'altres compostos orgànics, com fenols en fluids biològics (plasma i orina). En aquests casos no es tracta d'obtenir un factor elevat de concentració ja que el volum de mostra aplicat és petit, sinó que és important la selectivitat que s'obté i la possibilitat d'automatitzar el procés. Així, les SLM s'han aplicat per a determinar drogues bàsiques, com amperozida en aigua [24] i plasma [7], bambuterol en

plasma [25] i anestèsics [26], i fenols en plasma humà [14]. S'han descrit aplicacions en l'anàlisi d'aliments, com la determinació de triazines en sucs [27] o en olis [10], i aplicacions en la indústria del petroli, com la determinació de fenols en olis i fuels [28].

Un camp molt destacat és el de l'anàlisi mediambiental. Les SLM són adequades en molts casos per a l'extracció de compostos àcids i bàsics de manera senzilla emprant com a força impulsora un gradient de pH. Això ha afavorit l'aplicació de SLM per a diversos compostos que s'han extret i concentrat, sobretot, d'aigües naturals superficials [5]. S'ha descrit l'aplicació de la tècnica per a àcids carboxílics en aire [29] i sòls [30], per a anilines en aigües naturals [31] i per a derivats fenòlics com el 4-clorofenol o el 2,4,5-triclorofenol en aigües [32].

A la **Figura 4.1** es pot observar el principi bàsic del transport en el sistema SLM per a anàlits iònics, àcids carboxílics, amines i ions metàl·lics. En el cas dels compostos acídics, la fase de càrrega té un pH àcid i la receptora bàsic, ja que a pH àcid aquests compostos es protonen, es troben en forma no ionitzada, i poden transportar-se a través de la membrana. En aquestes condicions no es requereix cap extractant que faciliti el transport dels anàlits, ja que només variant el pH de les fases de càrrega i receptora es produeix el transport dels anàlits si es tria un dissolvent orgànic adient. Després de passar a través de la membrana, els compostos àcids neutres són ionitzats a la fase receptora, que ha de ser suficientment alcalina per prevenir la reentrada dels anàlits a la membrana, impedint així el procés invers. Així, s'obtenen fàcilment factors de concentració elevats, conjuntament amb una separació eficient de les substàncies húmiques i altres interferències presents en les mostres aquoses [5]. Per al 2,4-D, MCPA i altres herbicides acídics s'aconsegueixen eficàcies d'extracció de 0.7 i límits de detecció al voltant de 40 $ng \cdot L^{-1}$ tractant volums de 1 L (temps de contacte de 24 h) de mostres aquoses [15]. També s'han aplicat les SLM per a la determinació d'àcids carboxílics presents en mostres de sòl, obtenint eficiències d'extracció en l'interval de 14-75%, depenent en la polaritat i força acídica dels anàlits. El sistema permet la determinació d'àcids carboxílics de baixa massa molecular en presència d'ions interferents, com nitrits, clorurs, sulfats, cations ferro i alumini [30].

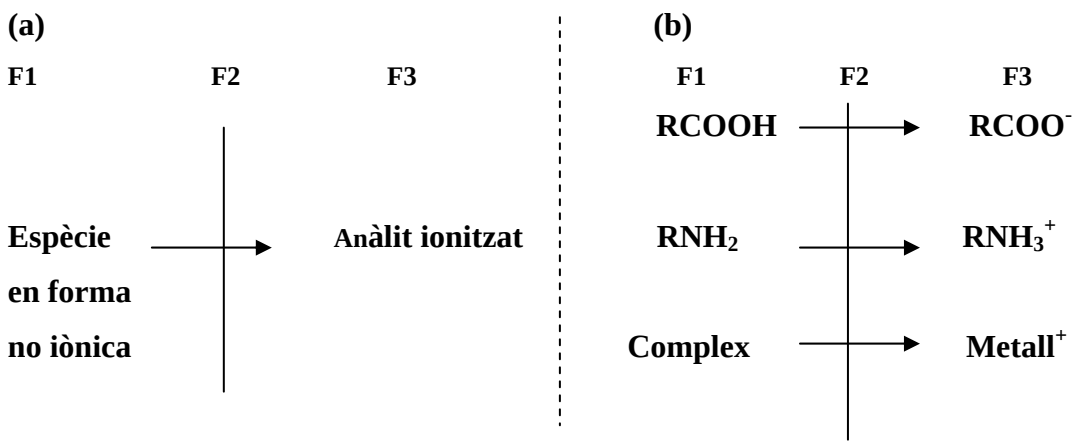


Figura 4.1. (a) Esquema del principi general d'extracció mitjançant membranes líquides suportades per a anàlits iònics, (b) Principi bàsic per a l'extracció d'àcids carboxílics, amines i ions metàl·lics utilitzant la tècnica de membranes líquides. (F1: Fase de càrrega; F2: Fase membrana; F3: fase receptora). Complex: metall + lligand.

El transport dels compostos bàsics també s'aconsegueix ajustant el pH de les fases de càrrega i receptora. En condicions de pH bàsic de la primera els compostos bàsics es troben en forma neutra i poden travessar la membrana líquida que està formada simplement per una dissolució orgànica (e.g. n-undecà o éter dihexílic). Utilitzant una fase receptora a pH àcid es facilita la protonació dels compostos bàsics i el seu pas cap a la fase de receptora. En el cas dels compostos bàsics, s'ha combinat la SPE amb les SLM per determinar herbicides triazínics en sucs emprant electroforesi capil·lar [27]. Una manipulació correcta de les condicions de l'extracció per SLM, principalment la velocitat de flux de la fase de càrrega i la relació entre els volums de fase càrrega i fase receptora, milloren els límits de detecció, disminuint-los fins a 10 $\mu g \cdot L^{-1}$. S'ha aconseguit arribar a límits de detecció de 15 $ng \cdot L^{-1}$ per a herbicides metoxi-s-triazínics utilitzant extracció mitjançant SLM i cromatografia líquida [11]. Els anàlits són extrets de la fase de càrrega a pH = 7 amb una membrana de politetrafluoroetilè (PTFE) impregnada amb dihexiléter. Després de la difusió a través de la membrana hidrofòbica els anàlits queden irreversiblement atrapats en una fase receptora acídica (pH = 1). La tècnica de SLM també s'ha aplicat a la determinació d'una droga bàsica, l'amperozida, per al tractament de mostres de sang [7]. Es requereix un enriquiment en tres etapes en un temps de 15 a 20 minuts arribant a límits de detecció d'amperozida en sang de 30 $ng \cdot L^{-1}$. La determinació d'amines ha estat estudiada amb aquesta

metodologia en mostres d'orina [33]. La mostra alcalina que conté l'amina entra en contacte amb una membrana de tefló impregnada amb n-undecà, mentre que en la fase receptora les amines són atrapades per una dissolució tamponant que protona els anàlits que arriben.

S'han determinat herbicides fenoxiacètics, entre ells 2,4-D, en llet bovina emprant membranes líquides suportades en geometria de fibra buida [34]. En aquest cas, la fibra es submergeix en una mostra de llet acidificada i els anàlits són extrets per la fase orgànica i reextrets a una fase receptora alcalina, on es desprotonen, obtenint-se factors de concentració de 900.

Es pot recórrer a l'acoblament "*on-line*" de SLM amb HPLC per aconseguir millors resultats. S'ha estudiat el fungicida metil tiofanat i el seus principals productes de degradació polars, carbendazima i 2-aminobenzimidazola, com a compostos de referència [35]. El sistema consta de dos sistemes de membrana i es connecta "*on-line*" a un sistema HPLC de fase invertida per a la determinació final. La membrana líquida suportada és utilitzada per a l'extracció de compostos ionitzats o carregats, la segona unitat, amb una extracció per membrana microporosa líquid-líquid (MMLLE), és apropiada per als compostos sense càrrega.

L'objectiu principal d'aquest capítol serà desenvolupar un mètode de membrana líquida per a concentració i "*clean-up*" dels extractes de sòls provinents del camp de golf "*Serres de Pals*". Els resultats obtinguts per extracció per membranes líquides es comparen amb els resultats obtinguts anteriorment mitjançant extracció en fase sòlida, així el millor dels mètodes s'utilitzarà pel seguiment dels components actius, 2,4-D i MCPA de l'herbicida comercial Bi-Hedonal® i els corresponents metabòlits en sòls d'un camp de golf.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. REACTIUS

- Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D): sòlid, 98.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA): sòlid, 97.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-metilfenol (2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-clorofenol (2-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-clorofenol (4-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2,4-diclorofenol (2,4-DCP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid sulfúric (H_2SO_4): líquid, 96 %, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Àcid o-fosfòric (H_3PO_4): líquid, 85 %, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Hidròxid sòdic (NaOH): sòlid, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Metanol (CH_3OH): líquid, , RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Hidròxid de tetrabutilamoni (TBA-OH): líquid, Fluka, Buchs, Suïssa.
- Decalina ($C_{10}H_{18}$): líquid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya.
- Decà ($C_{10}H_{22}$): líquid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya.
- Éter dihexílic ($C_{12}H_{26}O$): líquid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya.
- Cumè (C_9H_{12}): líquid, PS, Merk, Hohenbrunn, Alemanya.
- 1-dodecanol ($C_{12}H_{26}O$): líquid, PS, Merk, Hohenbrunn, Alemanya.
- Dodecà ($C_{12}H_{26}$): : líquid, PS, Merk, Hohenbrunn, Alemanya.
- Etanol (C_2H_6O): líquid, RS, > 99.8%, Carlo Erba, Milà, Itàlia.
- Nitrogen (N_2): gas, 99.999%, ref. 231, Carburos Metálicos, Barcelona, Espanya.

4.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolució estoc de 2,4-D, MCPA, 2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP, 2,4-DCP (c.a.100 $\mu g \cdot mL^{-1}$) per pesada del sòlid i arrasada amb aigua Milli-Q.
- Dissolució de treball de 2,4-D, MCPA, 2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP, 2,4-DCP per dilució dels estocs amb metanol o aigua Milli-Q.

4.2.3. APARELLS I MATERIALS

- Cromatògraf líquid Shimadzu (Kyoto, Japó) que incorpora un injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) amb un bucle de 20 µL, 2 bombes LC-9A, detector UV-Visible SPD-6AV, registrador Chromatopac C-R6A. Columna cromatogràfica Kromasil 100 C18 ODS (Teknokroma, Barcelona, Espanya) de 5 µm de tamany de partícula i amb unes dimensions de 20 cm de longitud i 0.46 cm de diàmetre). Per protegir la columna analítica s'empra una precolumna ODS (TR-C-160-1, Teknokroma, Barcelona, Espanya). El flux de treball utilitzat és de 1 $mL \cdot min^{-1}$ i l'anàlisi es realitza a 25±1ºC.
- Bomba peristàltica Minipuls 3 M312 (Gilson, Villiers Le Bel, França).
- Bany d'ultrasons (P. Selecta, Abrera, Espanya).
- Agitador rotatori (Dinko, Barcelona, Espanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de 0.45 µm de mida de porus (Whatman, Maidstone, UK).
- Tacòmetre IKA-TRON DMZ1 (Janke & Kunkel, Staufen, Alemanya)
- Font d'alimentació.
- pHmetre GLP22 (Crison, Barcelona, Espanya).
- Balança analítica electrònica A200S amb precisió de 0.1 mg (Sartorius Analytic, Göttingen, Alemanya).
- Sistema de purificació d'aigua Milli-Q (Millipore Ibérica, Barcelona, Espanya).

Membranes:

- Laminar: MILLIPORE GVHP (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Suport microporós de polidifluoroetilè amb un 75 % de porositat, 0.2 µm de mida de porus i 125 µm de gruix.
- Fibra tubular de polipropilè (Akzo Nobel, Wuppertal, Alemanya). Diàmetre intern 0.3 mm, diàmetre extern 0.5 mm, mida de porus 0.2 µm, porositat del 75 % i 57 cm de longitud.

4.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

4.2.4.1. Determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics

Els dos plaguicides es determinen mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució de parell iònic (IP-HPLC) i detecció UV-Visible a 230 nm, segons el mètode descrit al **Capítol 2**. Els productes de degradació del 2,4-D i MCPA que han estat determinats són 2-metilfenol (2-MP), 2-clorofenol (2-CP), 4-clorofenol (4-CP), 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP) i 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). Tal i com s'ha indicat al **Capítol 2**, la separació dels set compostos s'aconsegueix emprant una fase mòbil d'acetonitril i aigua (30:70, v:v) amb 10 mM TBAOH com a parell iònic i pH = 7.0. Les determinacions es fan a un flux de 1 $mL \cdot min^{-1}$ a 25 ± 1ºC. Totes les dissolucions de fase mòbil es filtren a través d'un disc de niló de 0.45 µm de mida de porus mitjançant una bomba de buit i es desgasifiquen durant 15 minuts al bany d'ultrasons.

El procediment d'extracció dels anàlits del sòl es realitza mitjançant una extracció alcalina amb hidròxid sòdic 0.01 M (tal i com s'ha explicat en el **Capítol 3**). Es realitza l'extracció durant 30 minuts a un agitador rotatori i es centrifuga la barreja del sòl i la dissolució extractant, separant el líquid supernedant. Aquest extracte, serà la dissolució a tractar mitjançant les membranes líquides suportades.

4.2.4.2. Experiments amb membrana líquida suportada

En els estudis amb SLM s'han utilitzat dos tipus de geometries: membranes laminars i fibra buida ("*hollow fiber*").

4.2.4.2.1. Membranes laminars

Els experiments amb membranes laminars s'han dut a terme en una cel·la de metacrilat (**Figura 4.2**) que consta de dos compartiments de 200 cm^3 de capacitat cada un, separats per una finestra circular de 3.8 cm de diàmetre on es col·loca la membrana. La membrana líquida consisteix en un dissolvent orgànic retingut en els porus d'un suport inert. Un cop impregnat, el suport es col·loca a la cel·la i s'hi introdueixen les dissolucions de càrrega i de retroextracció (200 mL en ambdós casos). El sistema d'agitació consisteix en unes pales de tefló accionades per uns motors connectats a una font d'alimentació. Per controlar la velocitat de rotació s'utilitza un tacòmetre. Es considera el temps zero en el moment que s'inicia l'agitació. Per fer el seguiment de l'extracció i retroextracció de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics es prenen mostres periòdicament del compartiment de retroextracció i s'analitzen segons el mètode IP-HPLC descrit al **Capítol 2.**

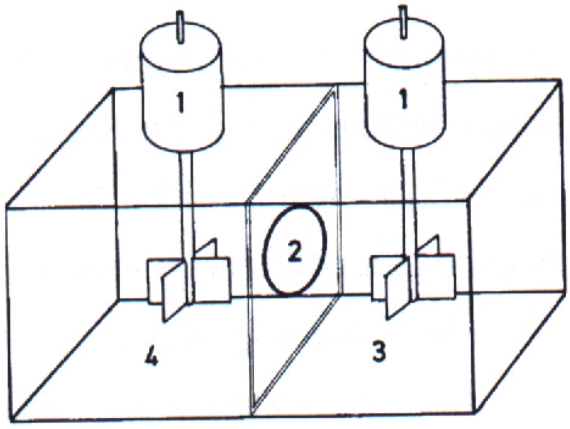


Figura 4.2. Esquema de la cel·la emprada en els experiments amb SLM en geometria laminar. 1. Motors, 2. Membrana, 3. Dissolució receptora, 4. Dissolució de càrrega. (Dibuix cortesia de C. Fontàs, Universitat de Girona).

S'han estudiat els diferents paràmetres que afecten el sistema per establir les condicions més favorables de retroextracció conjunta de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics. Aquesta geometria no permet fer una concentració dels anàlits d'interès ja que els volums de la fase receptora i de càrrega són iguals. Les millors condicions

obtingudes amb aquesta geometria s'han aplicat posteriorment a la concentració de 2,4-D, MCPA i metabòlits a partir de la geometria de fibra buida.

4.2.4.2.2. Fibra buida (*"hollow fiber"*)

El disseny emprat és el que es presenta a la **Figura 4.3.** El suport sòlid és una fibra buida amb una longitud de 57 cm, enrotllada en una vareta central. Aquesta fibra s'impregna amb el dissolvent orgànic que es fa passar pel seu interior amb l'ajuda d'una bomba peristàltica. Un cop impregnada es fa circular aigua, tant per l'interior com per l'exterior de la fibra, per eliminar les possibles restes de dissolvent. Aleshores, s'introdueixen les solucions de càrrega i receptora que es fan recircular durant tot l'experiment. Un cop finalitzat, per netejar la fibra es circula etanol per l'interior de la fibra i aigua per l'exterior per assegurar l'eliminació del dissolvent. Finalment s'asseca la fibra passant corrent de nitrogen. Mitjançant aquest procediment es pot utilitzar la mateixa fibra vàries vegades abans que s'observi deteriorament. La utilització de volums superiors de la dissolució de càrrega que de la dissolució receptora permet aconseguir concentracions elevades dels anàlits estudiats.

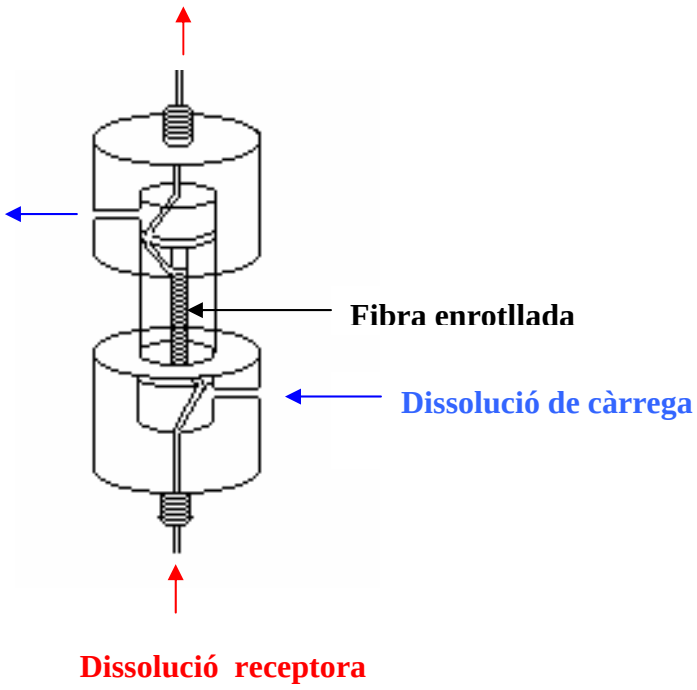


Figura 4.3. Mòdul de fibra buida ("*hollow fiber*") emprat en els experiments de concentració. (Dibuix cortesia de C. Fontàs, Universitat de Girona).

4.2.4.2.3. Sistema "*on line*" (HFSLM-HPLC)

Per aconseguir maximitzar l'eficàcia del procés es va dissenyar un sistema que permetés realitzar la concentració mitjançant el mòdul de fibra buida i seguidament fer l'anàlisi per IP-HPLC en continu. La **Figura 4.4** mostra l'esquema del sistema desenvolupat. En la posició (a) del sistema HFSLM-HPLC la dissolució a concentrar (càrrega) s'introdueix per fora de la fibra per la part superior i surt per la part inferior com a residu. Paral·lelament a la càrrega hi ha una segona via de circulació on la dissolució de retroextracció per el "*lumen*" de la fibra(en el nostre cas 1 mL hidròxid sòdic 0.01 M) actua de fase receptora. Prèviament hem impregnat la fibra amb éter dihexílic que ens permetrà l'extracció dels anàlits de la fase de càrrega a la fase receptora mitjançant una retroextracció. Durant el temps de concentració de la mostra la vàlvula està en la posició (a) on no hi ha entrada directa de la fase receptora cap al sistema cromatogràfic. Un cop finalitzat el temps de concentració es posa la vàlvula en posició (b) on s'arrossega la fase receptora ja enriquida amb els anàlits cap al sistema cromatogràfic.

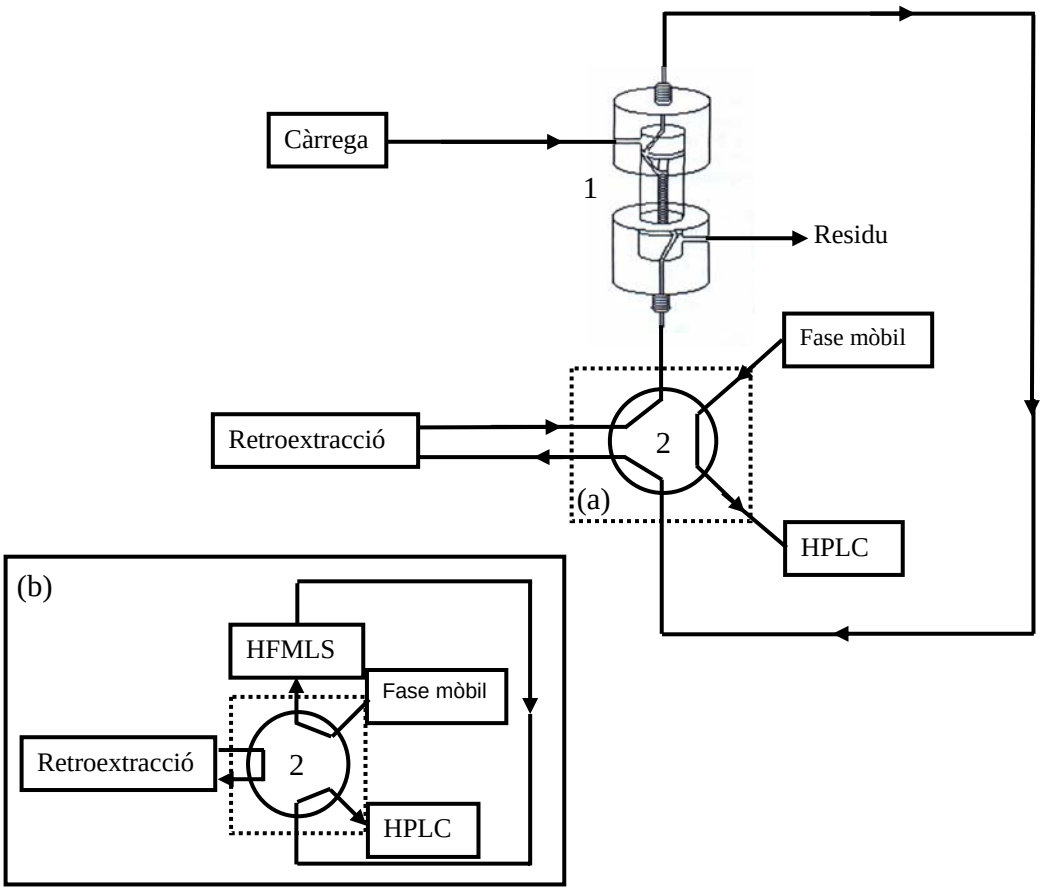


Figura 4.4. Diagrama esquemàtic del sistema utilitzat per a l'anàlisi dels herbicides acídics i metabòlits fenòlics. 1: mòdul "*hollow fiber*" 2: vàlvula de sis vies. Posició (a) mostra la posició de la vàlvula durant l'etapa de concentració de la mostra. Posició (b) mostra la posició de la vàlvula durant l'etapa de mesura.

4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.3.1. DISSENY DEL SISTEMA DE MEMBRANA LÍQUIDA

La geometria de membrana laminar s'ha utilitzat per avaluar les condicions químiques que permeten el transport dels anàlits d'interès des d'una dissolució aquosa de càrrega fins a una dissolució aquosa receptora a través de la membrana. Un cop determinades les condicions més adients de transport en aquesta geometria, s'avalua la concentració en la geometria de fibra buida ("*hollow fiber*").

Degut a les característiques dels anàlits d'interès, el més adient per al transport a través de la membrana és un transport no facilitat per gradient invers de pH [36]. En aquestes condicions l'eficiència d'extracció no està influïda per la concentració total d'anàlit en la fase receptora [37]. Les dissolucions de càrrega es preparen en medi 0.1 M d'àcid sulfúric per tenir els anàlits protonats (no ionitzats) en aquest compartiment. La fase receptora és una dissolució 0.01 M d'hidròxid sòdic on els anàlits es desprotonen i no és factible el seu retorn cap a la fase de càrrega (**Figura 4.5**). Aquestes condicions facilitaran el transport dels anàlits a través de la membrana.

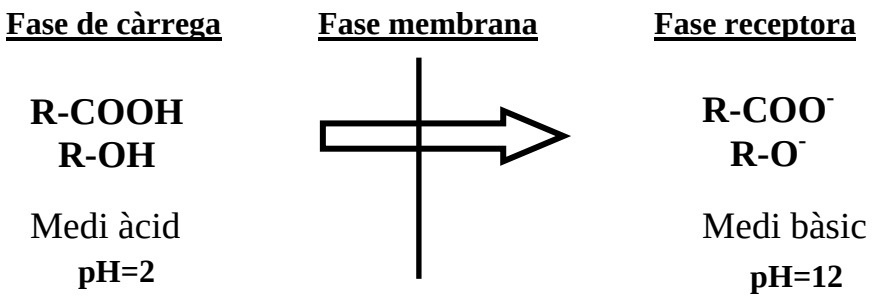


Figura 4.5. Esquema específic del mecanisme de transport amb SLM per a compostos de caràcter àcid. Els anàlits protonats passen a través de la membrana impregnada amb el dissolvent i queden desprotonats a la fase receptora on queden retinguts en no poder realitzar el procés invers.

4.3.1.1. Dissolvent orgànic

El sistema de membrana líquida suportada consta de tres fases, una fase orgànica (immobilitzada en els porus d'una membrana hidrofòbica) entre dos fases aquoses. El dissolvent orgànic que s'utilitza per impregnar els porus de la membrana és un dels paràmetres més importants a l'hora d'avaluar les condicions per a un transport adequat dels anàlits des de la fase aquosa de càrrega a la fase receptora. Un dissolvent polar a la membrana és idoni per obtenir coeficients de distribució elevats per a anàlits polars [38]. Llavors, per als anàlits avaluats en aquest estudi seria convenient utilitzar un dissolvent d'aquestes característiques. No obstant, els dissolvents polars són parcialment solubles en dissolucions aquoses i disminueixen l'estabilitat de la membrana. En aquest estudi s'han assajat diferents dissolvents aromàtics i alifàtics, i també barreges d'aquests per determinar la seva influència en l'extracció i retroextracció de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics. A la **Taula 4.1** es mostren els resultats obtinguts partint d'una dissolució d'1 $mg \cdot L^{-1}$ de cada anàlit per als sis dissolvents avaluats (éter dihexílic, éter dihexílic:decà 1:1; decà, cumè, decalina, dodecanol, dodecà:dodecanol 4%). En aquests estudis el temps d'extracció s'ha fixat en 2 hores ja que s'ha comprovat que, superat aquest temps, el cumè pot atacar el suport de la membrana i deformar els porus, el que provoca pèrdues de dissolució orgànica [36-38].

Taula 4.1. Percentatge de recuperació (%) obtingut en l'extracció d'herbicides fenoxiacètics (2,4-D i MCPA) i els seus metabòlits fenòlics utilitzant una geometria de membrana laminar. Condicions experimentals: 200 mL de H_2SO_4 0.1 M, dissolució de 1 $mg \cdot L^{-1}$ per a cada un dels anàlits (fase de càrrega); 200 mL de NaOH 0.01 M (fase de retroextracció); temps d'extracció: 2 hores; velocitat d'agitació: 1000 rpm. Els valors entre parèntesis indiquen les desviacions estàndard obtingudes (n=3).

Dissolvent orgànic	Recuperacions (%)						
	2-MP	2-CP	4-CP	MCPA	2,4-D	4-C-2-MP	2,4-DCP
DHE	73 (8)	80 (6)	76 (1)	72 (1)	67 (1)	86 (2)	78 (1)
DHE:Decà (1:1)	53 (1)	64 (3)	55 (6)	60 (5)	50 (3)	79 (7)	71 (4)
Decà	*	48 (4)	*	*	*	36 (4)	62 (6)
Cumè	48 (1)	68 (4)	51 (6)	47 (5)	34 (4)	79 (7)	78 (4)
Decalina	13 (1)	36 (1)	*	*	*	28 (1)	56 (1)
Dodecà: Dodecanol (4%)	19 (1)	43 (1)	25 (3)	44 (4)	35 (3)	57 (6)	65 (1)

(*) No s'ha observat transport de l'anàlit a través de la membrana.

L'éter dihexílic (DHE) i la barreja éter dihexílic:decà (1:1) són els dissolvents que proporcionen uns percentatges de recuperació més elevats en aquest sistema de geometria laminar, obtenint-se percentatges superiors al 50 % per a tots els anàlits. S'escull l'éter dihexílic com a dissolvent ja que les recuperacions són lleugerament superiors i, encara que sigui més polars que la barreja DHE:decà, la seva hidrofilitat és suficientment baixa com per considerar que aquest dissolvent no abandona els porus de la membrana per passar a les fases aquoses.

4.3.1.2. Temps d'operació

L'extracció per SLM és una combinació de dos processos: una primera extracció entre la fase de càrrega i el dissolvent orgànic, seguida d'una retroextracció cap a la fase aquosa receptora. Aquests dos processos tenen lloc simultàniament, fent que el procés sigui més eficientment que si les dues etapes tinguessin lloc successivament. L'estudi del temps d'operació està lligat al temps necessari per a què la massa transferida d'una fase a l'altra sigui màxima.

La **Figura 4.6** es recullen els valors d'eficiència d'extracció definits com la fracció de molècules d'anàlit que es recuperen a la fase receptora [5] obtinguts per a 2,4-D, MCPA, 4-CP i 4-C-2-MP a una i dues hores de temps d'operació utilitzant DHE com a dissolvent. S'observa que són necessàries més de dues hores per a la recuperació quantitativa dels anàlits. No obstant, no és necessari buscar els percentatges més elevats d'extracció en els sistemes de membrana líquida suportada, però sí és important buscar les condicions experimentals que donen valors reproduïbles d'extracció [37]. Per a tots els anàlits, s'han obtingut valors de desviació estàndard relativa entre 3 i 5 % en l'estudi de la repetibilitat dels percentatges d'eficiència d'extracció en condicions de SLM tant a una com a dues hores (6 replicats consecutius), el que indica que la repetibilitat en l'eficiència d'extracció de les membranes és adequada.

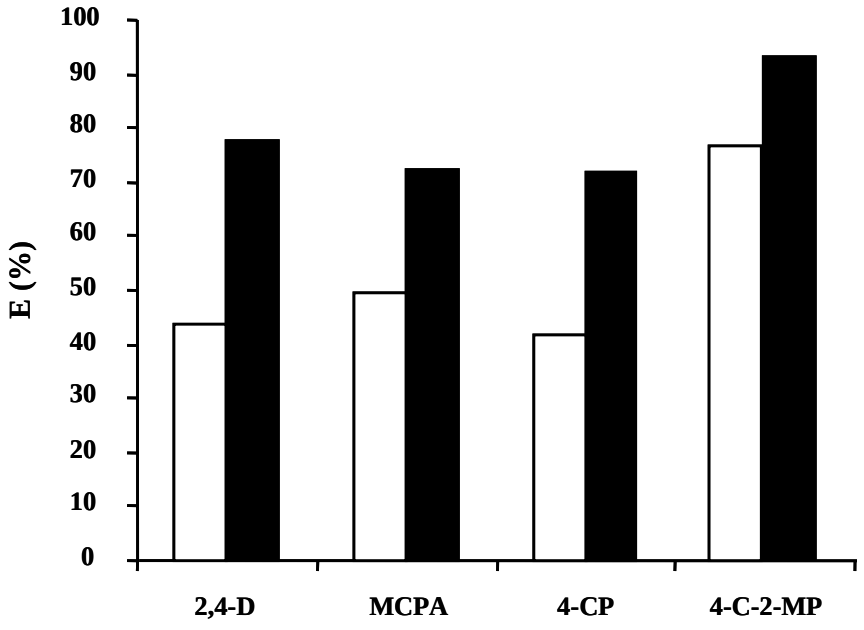


Figura 4.6. Efecte del temps d'operació per a la transferència de 2,4-D, MCPA, 4-CP i 4-C-2-MP en el sistema de SLM laminar. Les columnes en blanc mostren percentatges d'eficiència obtinguts després d'una hora i les columnes negres corresponen a dues hores.

Condicions experimentals: 200 mL de H_2SO_4 0.1 M, aigua fortificada a 1 mg·L^{-1} per a cada un dels anàlits (fase de càrrega); 200 mL de NaOH 0.01 M (fase de retroextracció); velocitat d'agitació: 1000 rpm.

4.3.2. EXPERIMENTS DE PRECONCENTRACIÓ

Un cop seleccionat el dissolvent més adient i demostrada la repetibilitat mitjançant els experiments en geometria laminar, es procedeix a avaluar la geometria "*hollow fiber*" per realitzar els estudis de concentració. Cal tenir en compte que aquesta geometria afavoreix l'estabilitat de la membrana. La geometria de fibra buida permet dos modes d'operació per a la circulació de la fase de càrrega i la fase de retroextracció, depenent de quina dissolució circula a través del "*lumen*", o part interior de la fibra, i quina dissolució circula per la part exterior o "*shell*". S'han estudiat aquestes dues opcions i els resultats es mostren a la **Figura 4.7** per a un temps d'operació de 2 hores. Com es pot observar, s'aconsegueixen valors d'eficiència d'extracció lleugerament superiors, sobretot per al 2,4-D i 4-CP, quan la fase de retroextracció circula per la part

interior de la fibra i la fase de càrrega a través de la part externa de la fibra del mòdul "*hollow fiber*".

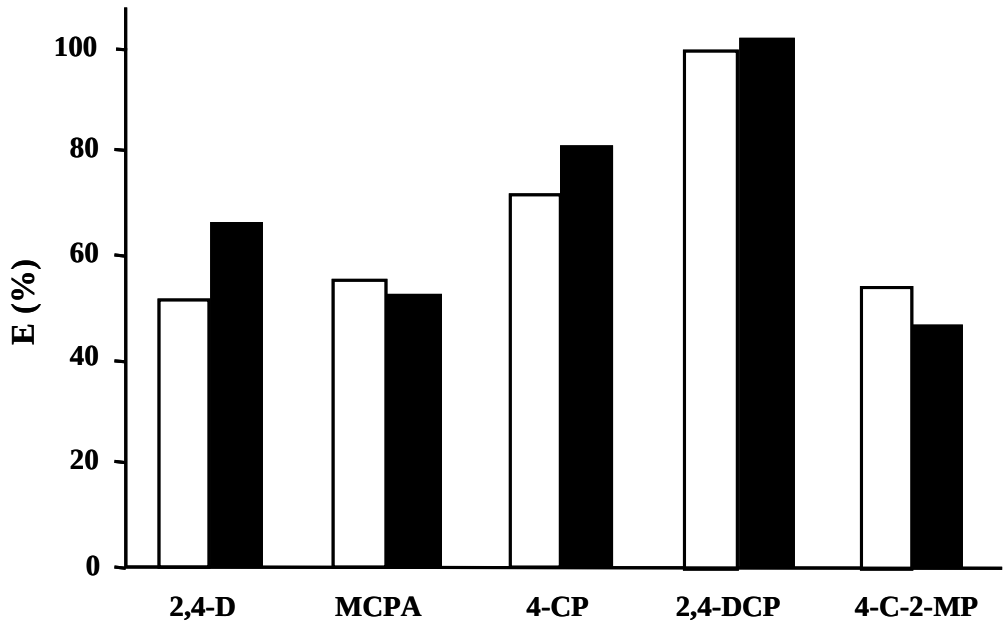


Figura 4.7. Estudi del mode d'operació per a la circulació de les fases de càrrega i de retroextracció (Temps d'operació: 2 hores).

Barres blanques: Percentatges d'eficiència obtinguts circulant 50 mL de dissolució de càrrega per l'interior de la fibra ("*lumen*") i 5 mL de dissolució de retroextracció per l'exterior.

Barres negres: Percentatges d'eficiència circulant 50 mL com a volum de càrrega per l'exterior de la fibra i 5 mL de fase receptora pel "*lumen*".

La geometria "*hollow fiber*" proporciona eficiències d'extracció similars a les obtingudes amb la geometria de membrana laminar plana utilitzant com a dissolvent éter dihexílic. No obstant, el més important és que amb la configuració de fibra buida s'aconsegueix concentrar els anàlits ja que en les condicions més adients el volum de la fase de càrrega és superior al volum de la fase de retroextracció. Els factors de concentració obtinguts recirculant 50 mL de fase de càrrega pel "*shell*" i 5 mL de fase receptora per dins de la fibra durant 1 hora són 2.2, 2.9, 4.4, 6.0 i 5.6 per a MCPA, 2,4-D, 4-CP, 2,4-DCP, i 4-C-2-MP, respectivament.

4.3.2.1. Anàlisi de mostres de sòls

La geometria de fibra buida s'ha aplicat a l'anàlisi d'extractes de sòls. L'extracte és el resultat de l'extracció alcalina dels anàlits del sòl amb una solució de NaOH 0.01 M (al **Capítol 3** s'explica en detall l'optimització d'aquesta etapa d'extracció alcalina).

Abans de procedir a l'anàlisi de mostres reals es procedeix a fer uns experiment preliminars amb sòls que no contenen els anàlits. Es realitza l'extracció alcalina d'aquests sòls per extreure els àcids húmics i fúlvics, així com altres substàncies que puguin actuar com a interferents en l'anàlisi posterior per IP-HPLC. Aquest extracte, sense presència dels anàlits d'interès, es fortifica amb quantitats conegudes dels anàlits. D'aquesta manera s'aconsegueix imitar al màxim la matriu que apareixerà a l'anàlisi de sòls contaminats, assegurant que no apareixeran problemes de pèrdues d'anàlit per envelliment de les mostres de sòl tal i com passaria si es fortifiqués directament el sòl i es deixés reposar abans de fer l'extracció alcalina [39]. La **Figura 4.8** mostra com la metodologia de membranes, a part d'aportar elevats factors de concentració en extractes de sòl fortificats, implica un alt nivell de "*clean-up*" i eliminació d'interferències. La **Figura 4.8 a** mostra la injecció directa d'un extracte alcalí fortificat amb 2,4-D i 4-CP. Es pot observar una banda ampla a l'inici del cromatograma deguda als àcids húmics i fúlvics coextrets que interfereixen en la determinació dels anàlits menys retinguts, com és el cas del 2,4-D en aquest exemple. L'anàlisi de la mateixa mostra després del tractament de l'extracte amb el mòdul de fibra buida (**Figura 4.8 b**) mostra la desaparició de les interferències degudes a les substàncies húmiques i fúlviques, les quals no han pogut passar a través de la membrana i han quedat en la fase de càrrega, mentre que els anàlits d'interès s'han pogut transportar cap a la fase receptora on, a més, s'aconsegueix la seva concentració. Mitjançant aquest sistema, com també han suggerit altres autors [36], s'aconsegueix un "*clean-up*" efectiu en mostres de sòls.

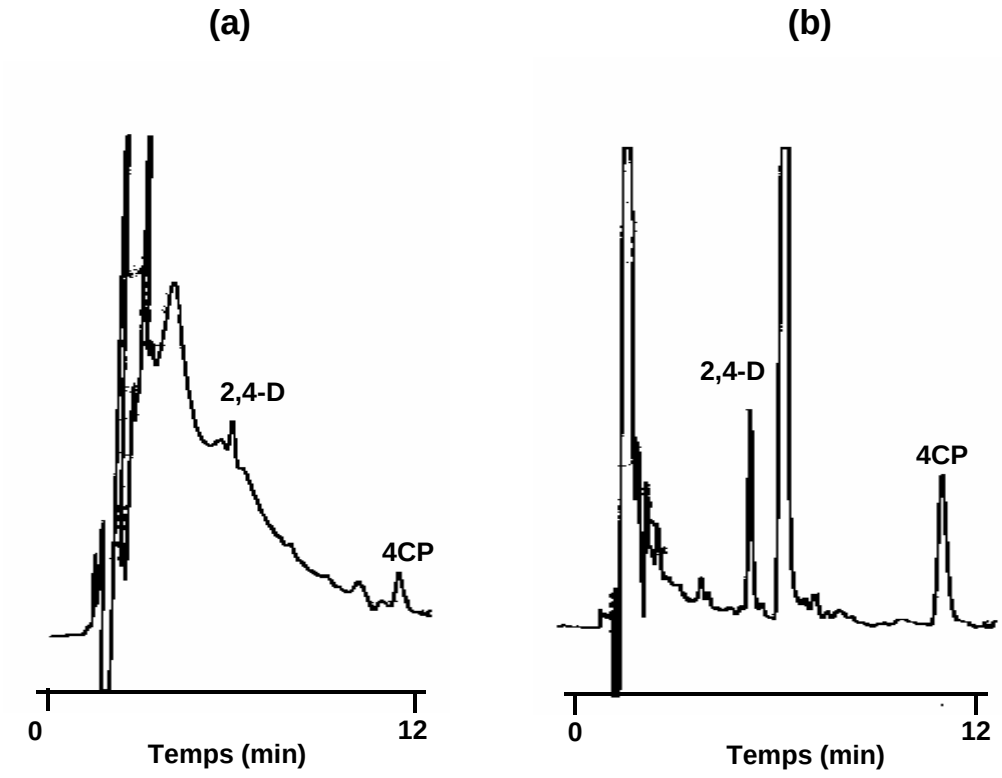


Figura 4.8. Cromatogrames obtinguts d'extractes de sòl fortificats amb 2,4-D i 4-CP a nivell de 1 mg·L^{-1}. (a): cromatograma de l'extracte acidificat sense tractament amb la fibra buida, (b): cromatograma després de ser concentrat amb la fibra buida.

L'estudi de diferents volums de fase de càrrega i fase receptora mostra que un volum de 20 mL de fase de càrrega (extracte de sòl acidificat a pH=1) i 1 mL de fase receptora (dissolució d'hidròxid sòdic 0.01 M) son adients per a l'aplicació del sistema HFSLM *"on-line"* amb el mètode IP-HPLC (**Figura 4.4**). Entre mostres cal realitzar una etapa de rentat de la fibra consistent en fer passar durant 20 minuts dissolució d'àcid sulfúric 0.1 M per l'exterior de la fibra i dissolució d'hidròxid sòdic 0.01 M per dins la fibra. Es convenient treballar a un flux de 0.6 mL·min^{-1} en la circulació de les dissolucions a través del mòdul de fibra buida. Fluxos superiors queden descartats en no permetre-ho les característiques de pressió interna pròpies del sistema i en disminuir l'eficiència de l'extracció degut a que el contacte no és tan efectiu, mentre que fluxos inferiors no son convenients en allargar el temps total d'anàlisi de cada mostra.

Un mòdul de membrana líquida de fibra buida impregnat amb éter dihexílic va ser subjecte d'estudi en les condicions esmentades durant 10 dies consecutius sense detectar pèrdues del dissolvent orgànic i obtenint desviacions estàndard relatives inferiors al 5% pel que respecte a la repetibilitat del sistema (4 replicats cada dia) i < 8% per a la reproduïbilitat (10 dies consecutius). Aquests resultats mostren que les condicions experimentals utilitzades en l'etapa de rentat són òptimes per regenerar la fibra i impedir la contaminació entre mostres.

La **Taula 4.2** mostra els resultats obtinguts en l'avaluació de la linealitat del mètode "*on-line*" desenvolupat. S'ha comprovat que el mètode és lineal en l'interval 1-25 $\mu g \cdot L^{-1}$ (anàlisi d'extractes de sòls fortificats). Aquests valors equivalen a concentracions en l'interval dels $\mu g \cdot kg^{-1}$ en sòls després de la concentració obtinguda amb el sistema *"on-line"* en les condicions i volums indicats prèviament. Els límits de detecció i quantificació trobats experimentalment per a tots els compostos a l'anàlisi de mostres de sòl fortificades són 0.1 i 0.3 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}, respectivament. Els límits de detecció es corresponen als valors amb una relació senyal/soroll ≥ 3 en els cromatogrames resultants.

Taula 4.2. Calibratges obtinguts per als set anàlits objecte d'estudi en l'interval de 1-25 $\mu g \cdot L^{-1}$. Els extractes de sòl van ser processats mitjançant el sistema de preconcentració "*on-line*" en la geometria de fibra buida i posteriorment analitzats per IP-HPLC.

Anàlit	a (s_a)	b (s_b)	r^2
2-MP	380 (75)	139 (5)	0.9978
2-CP	696 (159)	221 (11)	0.9951
4-CP	1350 (217)	848 (15)	0.9994
MCPA	522 (390)	678 (29)	0.9964
2,4-D	1106 (429)	449 (30)	0.9912
4-C-2-MP	2351 (479)	545 (31)	0.9936
2,4-DCP	323 (468)	646 (35)	0.9942

La **Figura 4.9 a** correspon al cromatograma d'una mostra de sòl fortificada a nivell de 1 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} amb 2,4-D, MCPA, 4-C-2-MP i 2,4-DCP, analitzada amb el sistema "*on-line*". També s'ha realitzat l'avaluació de mostres de sòl del camp de golf

"*Serres de Pals*", aquestes mostres contenen els anàlits d'interès ja que amb anterioritat a la pressa de mostra es va procedir a l'aplicació de l'herbicida Bi-Hedonal® sobre aquests sòls. Un exemple d'aquest tipus de cromatograma de mostres que ja contenen els anàlits es pot observar a la **Figura 4.9 b**. Els resultats de l'anàlisi de totes les mostres de sòl recollides en els diferents mostrejos es mostraran en el **Capítol 5**.

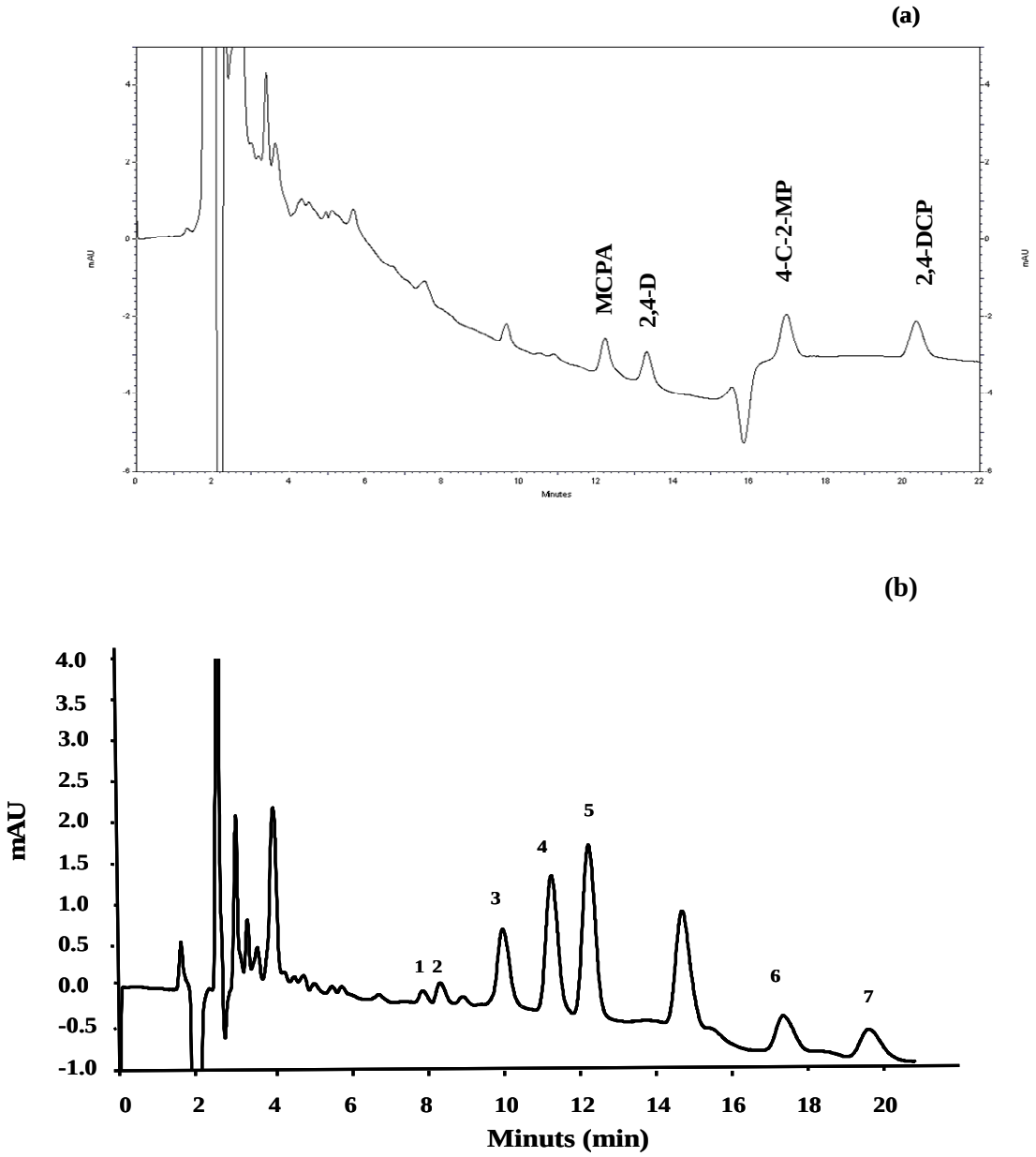


Figura 4.9. (a) Cromatograma d'una mostra de sòl fortificada a nivell de 1 μg·kg sòl^{-1} analitzat amb aquest sistema HFSLM "*on-line*". Anàlits estudiats: 2,4-D, MCPA, 4-C-2-MP i 2,4-DCP. (b) Cromatograma d'una mostra de sòl provinent del camp de golf "*Serres de Pals*" que conté (1) 2-MP,(2) 2-CP, (3) 4-CP, (4) MCPA, (5) 2,4-D, (6) 4-C-2-MP i (7) 2,4-DCP. Aquesta mostra correspon al dia següent de l'aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal®.

4.3.3. COMPARACIÓ DE RESULTATS DE SPE i SLM

La tècnica de preconcentració de membrana líquida en la geometria de fibra buida es compara amb la tècnica utilitzada al **Capítol 3**, l'extracció en fase sòlida. La **Taula 4.3** mostra els resultats de 5 mostres de sòls corresponents a diferents profunditats i temps després de l'aplicació de l'herbicida comercial. En la comparació de les dues tècniques s'observa que ambdues proporcionen un alt nivell en el "*clean-up*" en els extractes de sòls, també proporcionen un alt factor de concentració i una eficient separació dels anàlits en relació a la matèria orgànica present a les mostres de sòl. No obstant això, el sistema de membrana líquida aporta millors resultats, ja que la fase receptora és un medi aquós més compatible amb el mètode de detecció per IP-HPLC i tots els anàlits poden ser extrets i analitzats en una única fracció. La tècnica d'extracció en fase sòlida requereix l'elució dels anàlits en dues fraccions separades i necessita volums més elevats de dissolvents orgànics. SPE utilitza varis mil·lilitres de metanol per condicionar l'adsorbent i per eluir els anàlits, mentre que la geometria de fibra buida només utilitza uns quants microlitres d'éter dihexílic. A més, la geometria de fibra buida proporciona límits de detecció (0.1 µg · kg sòl^{-1}) inferiors a l'extracció en fase sòlida (3-10 µg · kg sòl^{-1}).

Taula 4.3. Concentració trobada (µg · kg sòl^{-1}) per als extractes de sòl avaluats amb les metodologies HFMLS i SPE. Condicions experimentals: 5 g de sòl i 15 mL de 0.01 M de NaOH. d: detectat però per sota del límit de quantificació i nd: no detectat. Les mostres de sòls corresponen segons simbologia: mostra A (30-60cm, agafada 22 dies després de l'aplicació de l'herbicida), mostra B (10-30cm agafada 37 dies després de l'aplicació de l'herbicida), mostra C (0-10cm, agafada 14 dies després de l'aplicació de l'herbicida), mostra D (0-10cm agafada 6 dies després de l'aplicació de l'herbicida), i mostra E (0-10cm agafada 9 dies després de l'aplicació de l'herbicida).

Sòl	Mètode	Anàlit						
		MCPA	2,4-D	2-MP	2-CP	4-CP	4-C-2-MP	2,4-DCP
A	SPE	nd	nd	nd	56	nd	61	nd
	HFSLM	0.8	0.4	nd	62	nd	57	nd
B	SPE	d	nd	nd	nd	nd	227	nd
	HFSLM	6	nd	nd	5	nd	188	nd
C	SPE	nd	nd	d	d	nd	nd	nd
	HFSLM	0.3	0.3	17	11	0.8	4	6
D	SPE	nd	nd	nd	131	nd	141	nd
	HFSLM	0.8	0.4	6	138	nd	106	nd
E	SPE	nd	nd	nd	nd	nd	27	nd
	HFSLM	0.4	0.6	5	nd	nd	14	nd

4.4. REFERÈNCIES

1. W. Thorstensen, A. Christiansen, *J. Agric. Food Chem*. 49 (2001), 4199.
2. M.J. Redondo, M.J. Ruiz, R. Boluda, G. Font, *J. Chromatogr. A* 719 (1996), 69.
3. J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, *J. Chormatogr. A* 959 (2002), 25.
4. J.L. Luque-Garcia, S. Morales-Muñoz, M.D. Luque de Castro, *Chromatographia* 55 (2002), 117.
5. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Trends Anal. Chem.* 18 (5) (1999), 318.
6. P.R. Danesi, *Sep. Sci. Technol.* 19 (11/12) (1984-1985), 857.
7. B. Lindegard, H. Björk, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, A-M. Olsson, *Anal. Chem.* 66 (1994), 4490.
8. G. Nilve, M. Knutsson, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr*. 668 (1994), 75.
9. J. Trocewicz, *J. Chromatogr*. 725 (1996), 121.
10. R. Carabias, E. Rodriguez, E. Hernandez, J. Hernandez, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995), 323.
11. N. Megersa, T. Solomon, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A* 830 (1999), 203.
12. L. Chimuka, N. Megersa, J. Norberg, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Anal. Chem.* 70 (1998), 3906.
13. N. Megersa, L. Chimuka, T. Solomon, J.A. Jönsson, *J. Sep. Sci*. 24 (2001), 567.
14. J. Norberg, J. Emneus, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, E. Burestedt, M. Knutsson, G. Marko-Varga, *J. Chromatogr. B* 701 (1997), 39.
15. M. Knutsson, G. Nilve, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992), 2413.
16. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Trends Anal. Chem.* 11 (3) (1992), 106.
17. Y. Shen, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chem.* 70 (1998), 946.
18. D.E. Barnes, G.D. Marshall, J.F. Van Staden, *Sep. Sci. Technol*. 17(9) (1982), 1183.
19. L.L. Tavlarides, J.H. Bae, C.K. Lee, *Sep. Sci. Technol*. 22 (2-3) (1987), 581.
20. B.M. Misra, J.S. Gill, "Supported Liquid membranes in metal separations", en "Chemical Separations with Liquid Membranes", ACS Symposium Series nº 642, R.A. Bartsch, J. Douglas Way (Eds.), Washington, DC (USA), 1996, ISBN: 0841234477.
21. J. De Gyves, E. Rodríguez de San Miguel, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999), 2182.
22. M. Papantoni, N. Djane, K. Ndun'u, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Analyst* 120 (1995), 1471.
23. C. Fontàs, "Disseny i caracterització de sistemes de membrana líquida per al transport de metalls del grup del platí. Aplicacions a la separació de Rh, Pd i Pt" (tesi doctoral), Universitat de Girona (2001).
24. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, B. Lindergard, J. Trocewicz, A.M. Olsson, *J. Chromatogr. A* 665 (1994), 259.
25. S. Palmarsdottir, E. Thordarson, L.E. Edholm, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chem.* 69 (1997), 1732.
26. Y. Shen, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chem*. 70 (1998), 946.
27. M. Khrolenko, P. Dzygiel, P. Wieczorek, *J. Chromatogr. A* 975 (2002), 219.
28. M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 852 (1999), 395.
29. L. Grönberg, Y. Shen, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A* 655 (1993), 207.
30. Y. Shen, V. Obuseng, L. Grönberg, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A* 725 (1996), 189.
31. J. Norberg, A. Zander, J.A. Jönsson, *Chromatographia* 46 (9-10) (1997), 483.
32. M. Knutsson, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Chromatographia* 42 (3-4) (1996), 165.

33. G. Audunsson, *Anal. Chem.* 60 (1988), 1340.
34. L. Zhu, K. Huey Ee, L. Zhao, H. Kee Lee, *J. Chromatogr. A* 963 (2002), 335.
35. M. Sandahl, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A* 975 (2002), 211.
36. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Trends Anal. Chem*. 18 (5) (1999), 325.
37. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A* 902 (2000), 205.
38. J.A. Jönsson, L. Mathiasson, B. Lindegard, J. Trocewicz, A.M. Olsson, , *J. Chromatogr. A* 665 (1994), 259.
39. G. Sirvent, "Desenvolupament de mètodes de determinació de compostos fenòlics en aigües i sòls. Caracterització dels processos d'adsorció en diferents tipus de sòls", (tesi doctoral), Departament de Química, Universitat de Girona, Girona (Espanya), 2005.

CAPÍTOL 5

ESTUDI DE L'ADSORCIÓ I TRANSPORT DE 2,4-D, MCPA I ELS SEUS METABÒLITS FENÒLICS EN SÒLS

CONTINGUTS CAPÍTOL 5:

5.1. INTRODUCCIÓ.....151

5.1.1. COMPORTAMENT DELS PLAGUICIDES EN EL SÒL.....153
5.1.1.1. Composició del sòl.....153
5.1.1.2. Adsorció de contaminants orgànics en sòls.....153
5.1.1.3. Isotermes d'adsorció.....155
5.1.1.3.1. Modelització de les isotermes d'adsorció.....157
5.1.1.4. Estudis d'adsorció en columnes de sòl.....159

5.2. EXPERIMENTAL.....161

5.2.1. REACTIUS.....161
5.2.2. DISSOLUCIONS.....161
5.2.3. APARELLS.....162
5.2.4. ÀREA D'ESTUDI.....163
5.2.4.1.Localització i situació geogràfica.....163
5.2.4.2. Qualitat de l'aigua de reg.....164
5.2.5. DETERMINACIÓ DE MATÈRIA ORGÀNICA EN ELS SÒLS.....166
5.2.6. EXPERIMENTS D'ADSORCIÓ EN DISCONTINU ("*BATCH*").....167
5.2.7. EXPERIMENTS D'ADSORCIÓ EN COLUMNA.....168
5.2.8. ESTUDI DE CAMP.....171

5.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....175

5.3.1. CARACTERITZACIÓ DE L'ADSORCIÓ. ASSAIGS DE LABORATORI.....175
5.3.1.1. Estudis en condicions d'equilibri. Experiments en discontinu ("*batch*").....175
5.3.1.1.1. Adsorció de 2,4-D.....177
5.3.1.1.2. Adsorció de MCPA.....180
5.3.1.1.3. Adsorció de 2,4-D i MCPA en competència.....182
5.3.1.2. Assaigs en columna.....183
5.3.2. ESTUDI DE CAMP.....190
5.3.2.1. Parcel·la instrumentada.....190
5.3.2.2. Aplicació de l'herbicida.....193
5.3.2.3. Anàlisi de sòls.....193

5.4. REFERÈNCIES.....200

5.1. INTRODUCCIÓ

Aquest estudi s'emmarca dins un projecte ampli, de caràcter interdisciplinari, per avaluar la reutilització d'aigües depurades i el seu ús com a aigües de reg estudiant el seu efecte sobre la qualitat de les aigües subterrànies, juntament amb la transformació i transport dels contaminants en sòls.

Els sistemes de reg amb aigües residuals tractades com a recurs hídric no convencional s'ha utilitzat tradicionalment en la perifèria de les grans ciutats, però no ha estat fins els darrers anys que ha rebut un gran impuls degut a l'augment del volum de les aigües residuals tractades i a l'existència de moltes regions àrides i semiàrides

mancades de recursos d'aigua. La importància d'aquest recurs és considerable si es té en compte que aproximadament el 60 % de la dotació d'aigua urbana residual es pot recuperar i tractar [1]. En els últims trenta anys s'ha incrementat l'interès per l'ús d'aigües residuals tractades per al reg de cultius i de zones verdes d'àrees urbanes, així com dels camps de golf distribuïts al llarg de la franja mediterrània. Així, un requeriment actual per a l'establiment de nous camps de golf és l'ús d'aigües procedents de depuradores per al reg.

L'aigua residual s'aplica directament sobre el sòl com a recàrrega artificial d'aqüífers o per a l'ús agrícola com a aigua de reg, constituint un bon substitut de l'aigua d'abastament i ajudant a la seva conservació. En el territori espanyol s'han dut a terme experiències controlades sobre l'ús d'aigües residuals procedents de fàbriques d'alcohol [2,3] i aigües residuals urbanes amb un cert grau de depuració [4]. La majoria d'aquests treballs es centren en l'estudi de la lixiviació de les substàncies contaminants aplicades a la superfícies del terreny i que poden originar la contaminació de les aigües subterrànies. En aquests treballs s'exposen les variacions en profunditat de diversos paràmetres fisicoquímics determinats en mostres d'aigua procedents de càpsules de succió o lisímetres. Tan sols el treball de Campos et al.[4] es centra en els riscs sanitaris en l'àmbit microbiològic.

Avui dia, existeix una gran preocupació sobre l'efecte dels plaguicides en el medi ambient i la seva infiltració cap a les aigües subterrànies pel transport d'aquests compostos a través de la zona no saturada del sòl. Els plaguicides són extensament utilitzats en el món agrícola i, actualment, també són molt utilitzats per garantir una qualitat adequada de la gespa en camps de golf. Els usuaris dels camps de golf demanen una gespa d'elevada qualitat i uniforme, el que requereix la utilització d'estratègies per maximitzar el control de plagucides i de nutrients presents.

En aquest marc cal una determinació efectiva d'aquests herbicides en el camp ja que constitueixen una amenaça per a la contaminació del sòl i de l'aqüífer. Per això, els estudis dels processos de transport i flux de contaminants en medi porós són de gran interès.

5.1.1. COMPORTAMENT DELS PLAGUICIDES EN EL SÒL

5.1.1.1. Composició del sòl

El sòl està constituït per una fase sòlida, una líquida i una altra gasosa. La fase sòlida conté els components orgànics i inorgànics que són els més interessants des del punt de vista de l'agricultura i que determinen en gran part el transport dels compostos. La fracció inorgànica consta fonamentalment de silicats (argiles), òxids i hidròxids, mentre que la fracció orgànica conté àcids orgànics i húmics que tenen un paper molt important en els processos d'adsorció. La fracció orgànica del sòl (humus) es troba lligada preferentment a la fracció d'argila i el conjunt d'aquests components és el principal adsorbent del sòl. Els components orgànics es troben orientats cap a l'exterior de la partícula i poden entrar en contacte amb els contaminants i interactuar-hi [5]. La capacitat d'adsorció dels plaguicides en el sòl ve afectada per tota una sèrie de paràmetres del sòl com el contingut d'aigua, matèria orgànica, pH, composició mineralògica, mida de les partícules, capacitat d'intercanvi iònic, concentració de contaminant i les propietats intrínseques del contaminant. Una de les propietats que cal considerar es el caràcter hidrofòbic/hidrofílic dels plaguicides ja que condiciona la seva solubilitat en aigua i afinitat per la matèria orgànica del sòl. Així, s'ha demostrat que hi ha una correlació directa entre l'hidrofobicitat del plaguicida i la seva persistència i acció tòxica [6].

El terreny sobre el qual es dipositen els productes utilitzats en els tractaments de protecció de conreus constitueix un medi físic capaç d'interactuar amb les molècules hostes mitjançant diferents mecanismes. Entre aquests, l'adsorció compleix un paper fonamental ja que la mobilització dels compostos al sòl a través dels processos de rentat, volatilització i percolació depen d'aquesta interacció. La presència de plaguicides en el sòl també ve donada per l'acció de l'aigua de drenatge que sol arribar a les aigües subterrànies i durant el recorregut pot afavorir el transport cap al subsòl.

5.1.1.2. Adsorció de contaminants orgànics en sòls

L'adsorció és un fenomen fisicoquímic que es produeix entre una molècula-adsorbat (en el nostre cas serà un anàlit orgànic) i una superfície sòlida anomenada adsorbent (en

el nostre cas serà el sòl). L'adsorció física és un procés que presenta energies d'enllaç petites, és ràpida i fàcilment reversible. L'adsorció química implica energies d'enllaç superiors a causa de les transferències d'electrons entre adsorbat i adsorbent. Així podem parlar de [6]:

- Fisisorció: les interaccions són febles, de tipus dipol-dipol o de Van Der Waals, i el procés és reversible.
- Quimisorció: les interaccions són fortes, degudes a enllaços d'hidrogen, i la reversibilitat és menor.

S'han realitzat nombrosos estudis d'adsorció de compostos orgànics en sòls. Crisanto et al. [7] estudien la influència de les propietats del sòl i de l'estructura dels plaguicides en la mobilitat d'aquests compostos en sòls. Molts autors conclouen que el contingut de matèria orgànica en el sòl és un factor determinant tant en el procés d'adsorció com el de desorció. Huang et al. [8] estudien l'adsorció però també el procés invers, la desorció, de l'atrazina en tres tipus de sòls. Conclouen que els sòls amb alt contingut en matèria orgànica retenen l'atrazina, mentre que en sòls amb un baix contingut en matèria orgànica el compost pot lixiviar. Abate et al. [9] estudien la influència dels àcids húmics en els procesos d'adsorció-desorció per a un determinat tipus de sòl per anàlits per l'atrazina. Coincideixen amb els estudis anteriors que la mobilitat dels compostos augmenta per capes més profundes de sòl en ser aquestes menys riques en contingut húmic. En ser el contingut de matèria orgànica un factor decisiu en l'adsorció dels anàlits en sòls, s'han comparat diferents situacions d'adsorbat-adsorbent per tal d'avaluar el seu comportament. Es compara l'adsorció de 1,2-diclorobenzè (1,2-DCB) en diferents sòls i turbes amb compostos benzènics clorats tals com clorobenzè (CB), 1,4-diclorobenzè (1,4-DCB), 1,2,4-triclorobenzè (1,2,4-TCB) i 1,2,3,4-tetraclorobenzè (1,2,3,4-TeCB) [10].

Una eina pràctica per a l'estudi de l'adsorció i la desorció d'un anàlit en sòls és l'assaig en columnes de sòl, on l'anàlit és afegit i eliminat contínuament del sistema. Ouyang et al [11] estudien el transport de Paraquat en columnes de sòl i conclouen que el factor determinant de l'adsorció és el contingut en matèria orgànica i amb molt més pes que altres paràmetres com poden ser el pH o la tipologia de sòl.

Un altre herbicida molt utilitzat per a usos agrícoles a la Xina és acetoclor. El comportament ambiental d'aquest compost, estudiat per Ye et al. [12], ve donat per unes

propietats químiques intrínseques tals com la pressió de vapor, la solubilitat d'aquest compost en aigua, l'activitat biològica i la resistència a canvis químics, i unes propietats extrínseques tals com l'activitat microbiològica del sòl, el seu contingut en matèria orgànica, la seva temperatura, la radiació solar, la pluviometria i la coexistència amb altres substàncies (àcids húmics i tensioactius).

Quant a àcids fenoxiacètics i clorofenols s'ha estudiat la seva adsorció-desorció en sòls volcànics utilitzant columnes de sòl mitjançant un model teòric que incorpora característiques d'adsorció/difusió, entre altres, per predir el moviment dels anàlits. Els resultats mostren que el transport dels clorofenols (2,4-diclorofenol, p-cloro-o-fenol i 2,4,5-triclorofenol) és més ràpid comparat amb el dels àcids fenoxiacètics (2,4-D i MCPA) [13]. Per al 2,4-D s'han realitzat estudis d'adsorció en la seva forma àcida i en la forma éster en sòls del Canadà, demostrant que l'adsorció és mínima per les dues formes [14]. Altres estudis amb 2,4-D on s'estudia l'adsorció, la mobilitat i la degradació en quatre sòls diferents són els de Johnson et al. [15] i Wilson et al.[16]. S'ha estudiat també la biodegradació del 2,4-D en sòls de Kènia [17] on s'observa una gran relació d'aquesta degradació amb l'exposició a la llum natural. L'adsorció d'aquest herbicida ha estat avaluada mitjançant experiments d'adsorció en discontinu. Per al MCPA s'han realitzat estudis en columna que mostren que el contingut en matèria orgànica dels sòls afecta la seva mobilitat [18]. Un estudi de camp avalua el commportament de 2,4-D i MCPA en una parcel·la de sòl destinada a ús agrícola i es monitoritza l'evolució d'aquests dos herbicides i sis metabòlits fenòlics [19]. Es confirma que la degradació de 2,4-D i MCPA als seus corresponents metabòlits fenòlics ve més afavorida per l'exposició solar que per l'acció microbiològica.

5.1.1.3. Isotermes d'adsorció

Els estudis de laboratori ens permeten caracteritzar l'adsorció dels anàlits en sòls. Una pràctica habitual és la determinació de les isotermes d'adsorció. Es defineix isoterma com la corba experimental que mesura (a temperatura constant) la quantitat de compost que s'adsorbeix en una quantitat fixa d'un sòlid adsorbent [6]. Són representacions gràfiques de les concentracions de solut adsorbides en el sòl en funció de les concentracions que queden en solució un cop el sistema ha assolit l'equilibri. Podem trobar diferents relacions isotèrmiques d'adsorció entre la capacitat d'adsorció, en µg solut·g adsorbent^{-1}, i la concentració residual de solut en solució, tal i com es

mostra a la **Figura 5.1**. El primer intent de classificar les isotermes fou el de Giles et al. [20] en 1922 que ja preveien diferents mecanismes d'adsorció sobre superfícies sòlides. Els quatre tipus bàsics d'isotermes són designats amb les lletres S, L (isoterma de Langmuir), C i H [6].

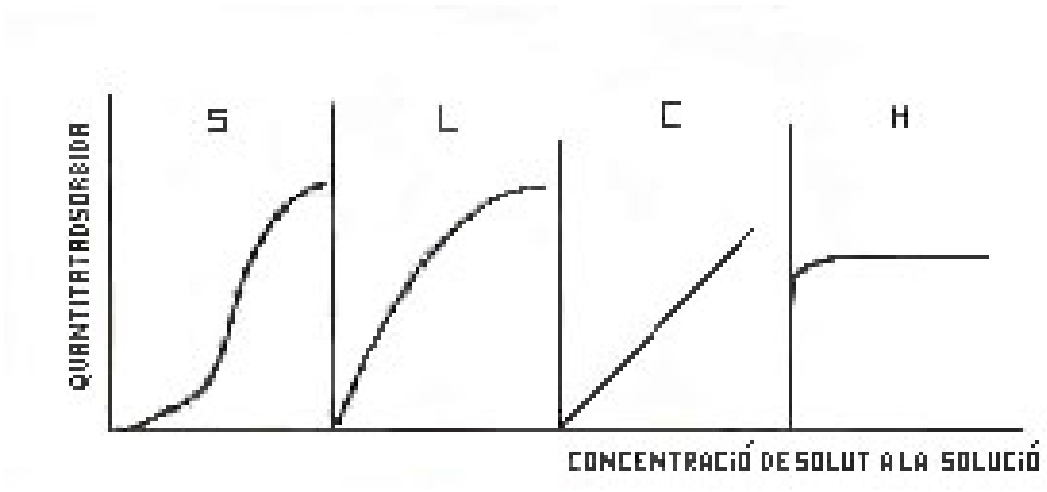


Figura 5.1. Representació gràfica dels principals tipus d'isotermes d'adsorció. A l'eix d'abcisses es representa la concentració de solut en solució a l'equilibri ($\mu g \cdot mL^{-1}$) i a l'eix d'ordenades la concentració de solut adsorbida a l'equilibri ($\mu g \cdot g^{-1}$).

a) Isoterma S

La isoterma S descriu una adsorció on no hi ha una única capa de molècules sobre l'adsorbent, sinó que hi ha una adsorció cooperativa en la que les interaccions de tipus adsorbat-adsorbat són més fortes que les interaccions entre l'adsorbat i la superfície del sòlid.

b) Isoterma L (isoterma de Langmuir)

Les isotermes tipus L descriuen una elevada afinitat entre l'adsorbat i l'adsorbent. L'adsorció creix en augmentar la concentració de solut fins que s'arriba a la saturació del sòlid.

c) Isoterma C

Les isotermes de tipus C descriuen una situació de partició que sovint suggereix la interacció entre un adsorbent hidrofòbic i un solut també hidrofòbic. Hi ha una relació constant entre la quantitat de solut fixat sobre el sòlid i la quantitat que resta en solució. Aquest tipus d'isoterma és poc freqüent a la pràctica, representa més aviat la situació inicial de les isotermes S i L, quan es treballa amb dissolucions molt diluïdes.

d) Isoterma H

Representa una situació de 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 a baixa concentració. Aquest perfil és típic en fenòmens de quimisorció amb l'establiment d'enllaços químics entre l'adsorbent i el solut on és poc favorable la reversibilitat.

5.1.1.3.1. Modelització de les isotermes

Existeixen un gran nombre d'equacions per descriure l'equilibri isotèrmic d'adsorció. L'expressió més simplificada d'una isoterma ve donada en el cas d'una isoterma lineal per l'anomenada llei de Henry:

$$q = K_H C_{eq} \qquad \textbf{(1)}$$

On q és la capacitat a l'equilibri (µg adsorbat·g adsorbent^{-1}), C_{eq} és la concentració a la solució a l'equilibri (µg adsorbat · mL^{-1}) i K_H és el coeficient de la llei de Henry. A concentracions baixes d'adsorbat a la fase líquida, les molècules adsorbides es troben molt separades en la superfície de l'adsorbent de forma que cap d'elles interaccionarà ni repercutirà en l'adsorció de les altres molècules, sent aquest sempre el cas ideal.

La majoria d'isotermes, especialment les tipus S i L, es poden descriure quantitativament utilitzant els models d'adsorció desenvolupats per Langmuir i Freundlich. Aquests dos models són encara els més utilitzats ja que ajusten bé les dades d'adsorció experimentals de molts sistemes adsorbent-adsorbat. A més, les dades experimentals són fàcils d'ajustar a les equacions generals de cada un dels models, bé

mitjançant models de regressió no lineals o per ajustos lineals de les seves equacions en forma logarítmica [21]. Ambdós models suposen una adsorció monocapa en la que no es donen interaccions entre les diferents molècules de solut.

El model de Langmuir considera un equilibri dinàmic en el que unes molècules d'adsorbat es van unint a la superfície del sòlid mentre es desorbeixen altres i s'arriba a l'equilibri quan s'igualen les velocitats dels dos processos. Aquest model suposa que la superfície de l'adsorbent és homogènia, que tots els punts d'enllaç són energèticament idèntics i que les molècules adsorbides ho fan en punts fixes sense interaccionar entre elles i no es desplacen sobre la superfície de l'adsorbent. Amb aquest model es pot calcular la capacitat d'adsorció màxima per a un solut qualsevol (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 [22]. El model de Langmuir ve donat per l'equació (2),

$$q = \frac{bQ_{\max}C_{eq}}{1 + bC_{eq}} \qquad \textbf{(2)}$$

on q és la capacitat a l'equilibri (µg adsorbat·g adsorbent^{-1}), Ceq és la concentració a l'equilibri (µg adsorbat·mL^{-1}) i b és un paràmetre d'afinitat.

Per explicar les isotermes també es pot aplicar el model de Freundlich. Encara que aquest model és empíric i no es basa en mecanismes fisicoquímics, s'utilitza molt sovint per a la descripció de les isotermes d'adsorció en dissolucions diluïdes [23-25]. El model es pot descriure mitjançant l'equació (3),

$$q = K_F C_{eq}^{1/n} \qquad \textbf{(3)}$$

on K_F és el coeficient d'adsorció de Freundlich que descriu la partició del solut entre les fases líquida i sòlida i $1/n$ és una constant relacionada amb la heterogeneïtat dels llocs d'adsorció a l'adsorbent. En dissolucions molt diluïdes es troba que n=1, amb el que el model de Freundlich és igual al de Henry i s'obté una isoterma lineal, tipus C.

S'han proposat altres models que descriuen els equilibris d'adsorció, similars als anteriors i més complexes. La majoria d'aquests, però, necessiten un nombre més elevat

de paràmetres a ajustar i precisen d'algorismes complexos. Per exemple, la isoterma de Redlich-Peterson 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. Tot i ser una equació vàlida per descriure molts sistemes, no és massa utilitzada degut a la dificultat que representa l'ajust de tres paràmetres [21].

Cap de les isotermes descrites té una aplicabilitat universal i tampoc hi ha una predicció millor amb l'ajust a un model en concret. Les expressions més senzilles són les de Langmuir i Freundlich, les quals generalment presenten un ajust correcte de les dades experimentals sense una excessiva complexitat en els càlculs.

5.1.1.4. Estudis d'adsorció en columnes de sòl

Les isotermes no descriuen la situació real de l'anàlit en el sòl ja que es determinen en condicions d'equilibri. Per avaluar els efectes que els plaguicides tenen a llarg termini es requereix l'estudi dels mecanismes de la seva interacció amb els components del sòl (dels quals donen informació les isotermes d'adsorció), però també cal estudiar el seu transport i reactivitat utilitzant models que defineixin el seu comportament i permetin preveure la seva evolució al llarg del temps [26]. Per fer el seguiment d'aquests contaminants cal aplicar principis cromatogràfics i fer simulacions en columnes de sòl en el laboratori. Aquestes tècniques, basades en els principis de transferència de matèria en medis porosos, permeten realitzar estudis controlats que proporcionen informació sobre mecanismes de transport i reactivitat. Els estudis en el laboratori tenen com a objectiu recopilar la informació necessària per preveure el comportament de cada substància contaminant en un escenari real [26].

En la descripció del moviment de compostos no volàtils que són retinguts pels processos d'adsorció en el sòl, es planteja una equació que representa el transport de matèria amb un flux d'aigua constant, relacionant la variació de la concentració amb el temps i la profunditat:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\rho}{\theta}\frac{\partial S}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - V\frac{\partial C}{\partial x} - \mu_w C - \frac{\rho}{\theta}\mu_s S \qquad \textbf{(4)}$$

on C és la concentració de solut en la fase líquida, S la quantitat adsorbida, t el temps, x la profunditat, ρ és la densitat aparent del sòl, θ el contingut volumètric d'aigua, D és el coeficient de dispersió hidrodinàmic i V és la velocitat mitjana de l'aigua. Els coeficients μ_w i μ_s són constants cinètiques de dissipació de primer ordre per a les fases de dissolució i adsorbida respectivament [26]. La resolució de l'equació (4) és ràpida quan al solut li correspon una isoterma d'adsorció lineal (la modelització del transport de soluts contaminants es simplifica moltes vegades suposant aquesta isoterma lineal). S'han investigat molts models que assumeixen la linealitat de la isoterma i contemplen els processos de no-equilibri [27].

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. REACTIUS

- Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D): sòlid, 98.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- Àcid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic (MCPA): sòlid, 99.1%, Dr.Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-metilfenol (2-MP): sòlid, 99.5% , Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 2-clorofenol (2-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-clorofenol (4-CP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanya.
- 4-cloro-2-metilfenol (4-C-2-MP): sòlid, 99.5%, Dr. Ehrenstorfer Gmbh, Augsburg, Alemanya.
- 2,4-diclorofenol (2,4-DCP): sòlid, 99.5 %, Dr. Ehrenstorfer Gmbh, Augsburg, Alemanya.
- Hidròxid sòdic (NaOH): sòlid, PA, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Clorur de calci ($CaCl_2$): sòlid, PRS, Panreac, Barcelona, Espanya.
- Hidròxid de tetrabutilamoni (TBA-OH): líquid, Fluka, Buchs, Suïssa.
- Àcid pentafluorobenzoic ($C_7HF_5O_2$): Sigma-Aldrich, Steinheim, Itàlia.
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Bi-Hedonal®: líquid (27.5% p/v) en forma de sal d'amina que conté 2,4-D i MCPA), Bayer Hispania Industrial S.A., Barcelona, Espanya.

5.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolució estoc de 2,4-D, MCPA, 2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP, 2,4-DCP (c.a. 100 $mg \cdot L^{-1}$) per pesada del sòlid i arrasada amb aigua mil·li-Q.
- Dissolució de treball de 2,4-D, MCPA, 2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP, 2,4-DCP per dilució dels estocs amb aigua mil·li-Q.
- Dissolucions de pentaflurobenzoat sòdic obtinguda a partir d'àcid pentafluorobenzoic i NaOH.

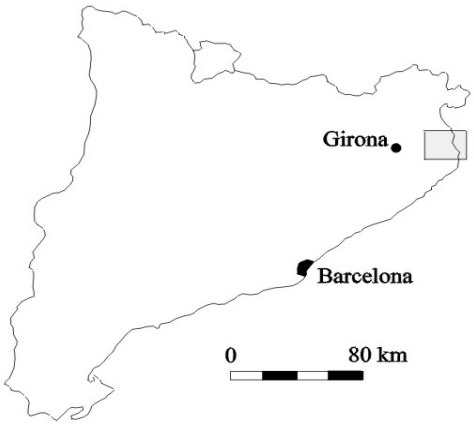
5.2.3. APARELLS I MATERIALS

- Cromatògraf líquid Shimadzu (Kyoto, Japó) que incorpora injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) amb un bucle de 20 µL, 2 bombes LC-9A, detector UV-Visible SPD-6AV, registrador Chromatopac C-R6A, columna cromatogràfica de 20 cm x 0.46 cm i.d. empaquetada amb fase sílica Kromasil 100 C18 ODS (Teknokroma, Barcelona, Espanya). Per protegir la columna analítica es va emprar una precolumna ODS (TR-C-160-1, Teknokroma, Barcelona, Espanya). El flux de la fase mòbil és de 1 $mL \cdot min^{-1}$ i l'anàlisi es realitza a 25±1ºC.
- Bomba peristàltica Minipuls 3 M312 (Gilson, Villiers Le Bel, França).
- Bany d'ultrasons (P. Selecta, Abrera, Espanya) per desgasificar les fases mòbils.
- Agitador rotatori (Dinko, Barcelona, Espanya).
- Centrífuga Mixtasel (Selecta, Barcelona, Espanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de mida de porus 0.45 µm (Whatman, Maidstone, UK).
- pH-metre GLP22 (Crison, Barcelona, Espanya).
- Conductímetre 524 complet (cèl·lula 52-90) ref. 01-524-01 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Espanya).
- Balança analítica electrònica A200S amb tolerància ±0.1 mg (Sartorius Analytic, Göttingen, Alemanya).
- Sistema de purificació d'aigua Milli-Q (Millipore Ibérica, Barcelona, Espanya).
- Filtres de membrana d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm (Whatman, Maidstone, UK).
- Xeringa per a HPLC de 100 µL (Hamilton, Bonaduz, Suïssa).
- Col·lector de fraccions (Gilson, Villiers Le Bel, França).
- Espectrofotòmetre Diode Array 8452A (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemanya).

5.2.4. ÀREA D'ESTUDI

5.2.4.1. Localització i situació geogràfica

La zona d'estudi es troba a la comarca del Baix Empordà, província de Girona, en el camp de golf *"Serres de Pals"*, entre les poblacions de Pals i Torroella de Montgrí tal com es mostra a la **Figura 5.2**. És un camp de golf de construcció recent que pretén absorbir part de l'elevada demanda que té la pràctica d'aquest esport per part d'un turisme cada cop més exigent i selectiu.



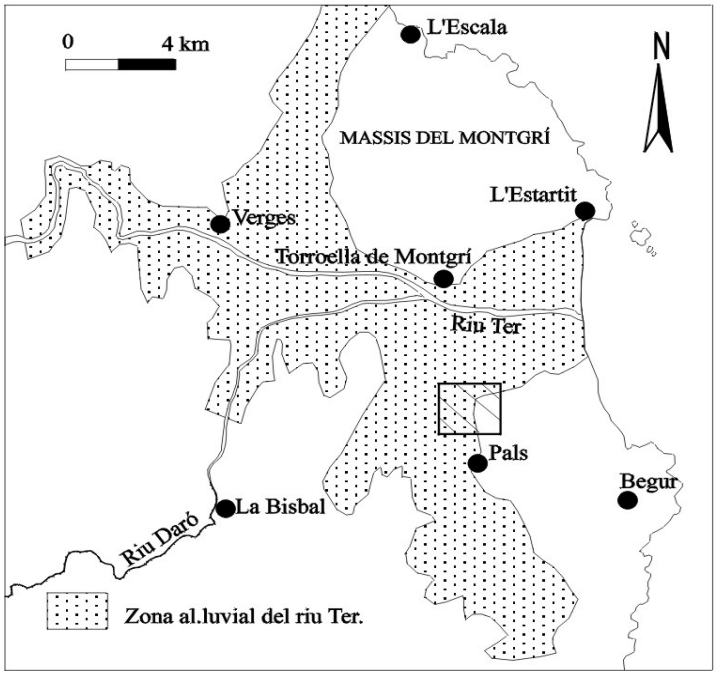


Figura 5.2. Situació geogràfica de l'àrea d'estudi.

5.2.4.2. Qualitat de l'aigua de reg

Des del mes de juliol del 2000 l'Estació Depuradora d'Aigua Residual (EDAR) de Pals subministra aigua regenerada per al reg del camp de golf "*Serres de Pals*". Atesa l'elevada qualitat de l'aigua depurada a l'EDAR de Pals (baixes demandes bioquímiques d'oxigen (DBO) i matèria en suspensió (MES) i un grau elevat de nitrificació-desnitrificació) l'únic tractament que es realitza és una desinfecció fins a assolir un nivell elevat de desinfecció de l'aigua. Aquesta procés es fa mitjançant l'addició d'hipoclorit en la canonada que va per gravetat fins a una de les basses del camp de golf. El disseny de la captació es va fer de manera que l'aportació d'aigua fos regular, quant a cabal, durant tot el dia, despreciant les puntes horàries de l'estiu que haurien obligat a col·locar una tub de diàmetre més gran o bé a la impulsió de l'aigua. El cabal captat i subministrat en els mesos punta arriba als 1600 $m^3 \cdot dia^{-1}$ i la dosi d'hipoclorit aportada sol ser d'uns 15 mg $Cl_2 \cdot L^{-1}$, amb una concentració mitjana de Cl_2 residual lliure i residual total de 1 i 2 $mg \cdot L^{-1}$ respectivament. Amb aquesta dosi s'ha observat que la qualitat bacteriològica de l'aigua a l'arribada a les basses d'emmagatzematge del camp de golf és altament satisfactòria. En la **Taula 5.1** es presenten els resultats analítics de l'aigua depurada en aquesta EDAR durant l'any 2000. Els cabals d'aigua subministrada al camp de golf presenten valors que oscil·len entre 2300 m^3 el mes de desembre i 43000 m^3 enregistrats el mes de juliol i agost.

Les aportacions de nutrients realitzades per l'aigua d'aquesta EDAR són molt diferents de la resta de EDARs de la zona, especialment pel que fa al nitrogen. El fet que l'EDAR de Pals estigui molt sobredimensionada permet que s'assoleixi una elevada desnitrificació durant tot l'any, el que fa que les aportacions d'aquest element siguin petites i inferiors a les de fòsfor. Les aportacions de potassi, en canvi, són elevades perquè aquest element és abundant en l'aigua regenerada com a conseqüència de l'elevada conductivitat elèctrica que presenta l'aigua potable de la zona.

Taula 5.1. Mitjanes mensuals dels paràmetres de qualitat físico-química de l'efluent secundari de l'EDAR de Pals durant l'any 2000. Anàlisis realitzades pel laboratori de SEARSA a Torroella de Montgrí.

mesos	**DBO, mg·L^{-1}**	**DQO, mg·L^{-1}**	**MES, mg·L^{-1}**	**pH**	**CE, dS·m^{-1}**	**Nitrogen total, mg N·L^{-1}**	**Fòsfor total, mg P·L^{-1}**
gener	2	54	3	7,3	2,4	10,0	9,5
febrer	2	80	7	7,3	3,6	7,9	8,0
març	2	100	6	7,4	3,4	5,0	6,1
abril	4	103	8	7,3	3,0	9,0	3,7
maig	2	89	6	7,3	3,6	12,0	2,0
juny	2	98	8	7,2	3,2	10,2	2,6
juliol	2	115	5	7,5	3,3	12,2	1,6
agost	3	103	6	7,4	3,7	12,5	3,5
setembre	2	114	6	7,3	3,5	11,6	2,2
octubre	2	64	4	7,5	2,5	10,3	1,7
novembre	2	85	5	7,3	2,5	10,2	2,3
desembre	2	83	5	7,4	1,8	8,4	0,3
Mitjana anual	2	94	6	7,4	3,1	10,4	3,5
Màxim valor puntual (*)	5	131	13	7,8	5,8	24,7	15,5
Mínim valor puntual (*)	1	40	1	7,0	1,1	3,3	0,2

(*) Valors màxims i mínims de la suma de les espècies nitrogenades determinades simultàniament en una mostra.

Inicialment, els elevats valors de salinitat havien posat en dubte la viabilitat de l'aprofitament d'aquesta aigua regenerada, almenys de forma continuada en el temps. No obstant això, els resultats del primer estiu van mostrar com, amb una gestió adequada, aquest paràmetre no hauria de ser un impediment per al correcte desenvolupament de la majoria d'espècies vegetals plantades en el golf.

5.2.5. DETERMINACIÓ DE MATÈRIA ORGÀNICA EN ELS SÒLS

La matèria orgànica del sòl juga un paper important en la retenció i transport dels contaminants en aquest compartiment ambiental. El conjunt de totes les formes en què es presenta el carboni representa el carboni total del sòl. Malgrat això, l'anàlisi i les dades que posteriorment s'utilitzen es refereixen a la fracció oxidable, que només inclou els compostos orgànics humificats. L'anàlisi permet l'obtenció d'informació indirecta sobre les propietats físiques del sòl, atesa la influència que té la matèria orgànica sobre la retenció d'aigua, l'aireig i l'estructuració del sòl .

El mètode emprat ha estat una valoració per retrocés amb sal ferrosa que permet determinar l'excés de dicromat potàssic. Per diferència, es calcula el dicromat potàssic que ha reaccionat, equivalent al carboni orgànic contingut a la mostra. Per realitzar la conversió de carboni orgànic a matèria orgànica, cal multiplicar pel factor de Van Bemmelen, que és deduït estadísticament i suposa que la matèria orgànica del sòl conté un 58% de carboni orgànic.

$$\% \text{ MO} = \% \text{ C } 1.72 \qquad \textbf{(5)}$$

A la **Taula 5.2** es mostren el valors de matèria orgànica, pH i conductivitat per a una sèrie de mostres de sòl provinents del camp de golf. Els valors de pH i conductivitat han estat obtinguts posant en contacte 10 g de sòl amb 25 mL d'aigua i posant la barreja 10 minuts a agitació mecànica. Es deixa reposar 30 minuts, es filtra i es realitzen les mesures de pH i conductivitat en el filtrat.

Taula 5.2. Dades de matèria orgànica, pH i conductivitat de mostres de sòl provinents del camp de golf "*Serres de Pals*".

mostra	Dies després aplicació herbicida	Profunditat (cm)	% MO	pH	Conductivitat ($\mu S \cdot cm^{-1}$)
1	1	0-10	1.83	8.62	411
2	3	0-10	1.71	8.80	441
3	6	0-10	2.08	8.97	381
4	14	0-10	2.12	8.92	292
5	37	10-30	1.00	8.90	190
6	22	30-60	0.26	8.36	692

5.2.6. EXPERIMENTS D'ADSORCIÓ EN DISCONTINU ("*BATCH*")

Els experiments en discontinu s'han portat a terme en tubs de vidre de 25 cm^3 de capacitat emprant un agitador rotatori. Es considera el temps igual a zero el moment que s'inicia l'agitació. Per fer el seguiment de l'adsorció de 2,4-D i MCPA es prenen mostres a intervals de temps preestablerts. Aquestes mostres s'analitzen amb el mètode IP-HPLC descrit al **Capítol 2**. S'han estudiat els diferents paràmetres que afecten el sistema per establir les condicions més adients de distribució del 2,4-D i MCPA. S'han provat diverses configuracions de rotació (e.g. orbital, rotatòria). Es treballa amb unes relacions sòl:dissolució de 1:2 i 1:4 per a tots els compostos, per tal de fixar quines són les millors condicions d'adsorció.

Els assaigs d'adsorció s'han realitzat seguint les etapes següents:

1) es col·loquen 5 g de sòl en els tubs de vidre i es posen en contacte amb 20 mL de $CaCl_2$ 0.5 mM, agitant durant 24 hores per estabilitzar la força iònica de la solució aquosa i la càrrega de les partícules.
2) es centrifuguen els tubs durant 10 minuts a 400 rpm i es separa la fase líquida de la sòlida.
3) s'afegeix a la fase sòlida, que es manté en el tub de vidre, el volum de solució amb les diferents concentracions de l'herbicida en cada un dels recipients. Aquestes dissolucions es troben en medi $CaCl_2$ 0.5mM.

4) els sòls en contacte amb les solucions de contaminants són agitats a velocitat constant a diferents valors de temps, fins arribar a l'equilibri, per obtenir les dades cinètiques d'adsorció en funció del temps.
5) es centrifuga durant 20 minuts a 400 rpm i el filtrat es passa per un filtre de 0.22 μm per tal de separar adequadament la fase sòlida de la líquida.
6) es determina en la solució aquosa la concentració resultant del contaminant pel mètode IP-HPLC descrit i desenvolupat al **Capítol 2**.

La determinació de les isotermes d'adsorció del 2,4-D i MCPA s'ha realitzat a una temperatura controlada de 25±1 ºC, agitant 24 hores.

5.2.7. EXPERIMENTS D'ADSORCIÓ EN COLUMNA

S'han realitzat estudis d'adsorció dels herbicides en condicions dinàmiques, emprant columnes tancades. En aquest cas, a l'igual que en els estudis en discontinu, també cal un pas previ de condicionament del sòl fent passar en continu una dissolució de clorur càlcic amb l'ajuda d'una bomba peristàltica. Llavors, s'injecta el plaguicida amb ajuda d'una vàlvula de 6 vies i es recullen fraccions a intervals predeterminats de temps. El control de les condicions hidrodinàmiques del sistema, és a dir el cabal, és molt important. Per avaluar el sistema es realitzen assaigs previs amb un traçador no retingut pel sòl que es pugui seguir fàcilment en continu mitjançant un espectrofotòmetre UV-Visible de matriu de díodes.

La tècnica utilitzada per a l'assaig del flux a través de la columna ("*miscible displacement experiment*") és molt similar a la descrita per Alvarez et al. [26]. S'han utilitzat cilindres d'acer amb 10 mm de diàmetre intern i 10 cm de llargada. Per assegurar una bona estanqueïtat es posen unes frites de politetrafluoroetilè (PTFE), amb 25 μm de porus, als extrems. Un esquema de la columna es pot veure a la **Figura 5.3.**

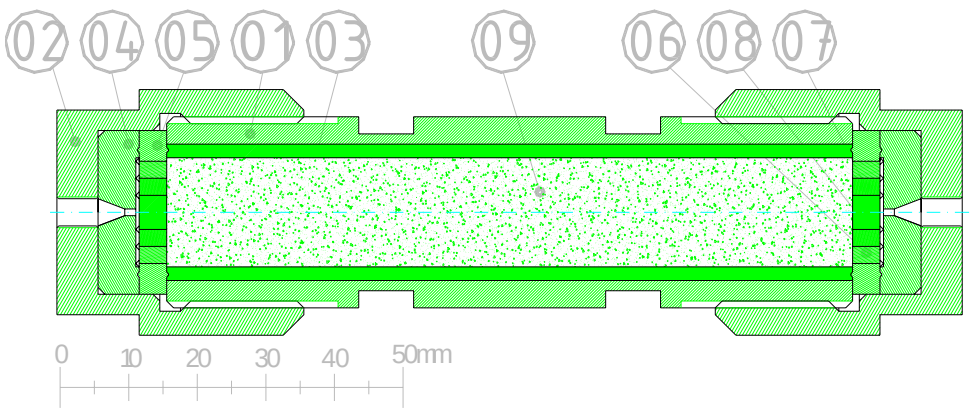


Figura 5.3. Esquema de la columna utilitzada per als experiments en flux. Les parts més importants són: (1) paret d'acer, (2) cargol de tancament, (3) paret de plàstic, (4) tòrica de plàstic per l'ajustament dels connectors, (5) tòrica d'ajustament entre el tub de plàstic i la tòrica exterior, (6), (7)i (8) són anells concèntrics que actuen com a filtres i distribueixen uniformement l'aigua, (9) mostra de sòl.

El disseny de columna permet realitzar l'assaig per a diferents condicions de pressió, entre 1 i 250 bars. Es connecta la columna a una bomba peristàltica, utilitzant la vàlvula de 6 vies per seleccionar les diferents solucions d'interès. Les solucions que surten de la columna van directament al detector de matriu de díodes o són recol·lectades en alíquotes de 3 mL utilitzant un col·lector de fraccions. Una representació esquemàtica del sistema complet es pot veure a la **Figura 5.4.**

Prèviament als experiments d'adsorció de l'herbicida es realitza una injecció d'una dissolució d'un traçador, pentafluorobenzoat sòdic (PFBNa) a concentració 25 mM. Aquest compost no s'adsorbeix en el sòl i per tant només patirà dispersió física a la columna i permetrà avaluar el correcte empaquetament de la mateixa. S'utilitzen dissolucions de 2,4-D (100 $\mu g \cdot mL^{-1}$) per als experiments d'adsorció a través de la columna de sòl. Una solució de 0.5 mM de $CaCl_2$ s'utilitza com a solució electrolítica per a l'estabilització del sòl, similar als mètodes en discontinu.

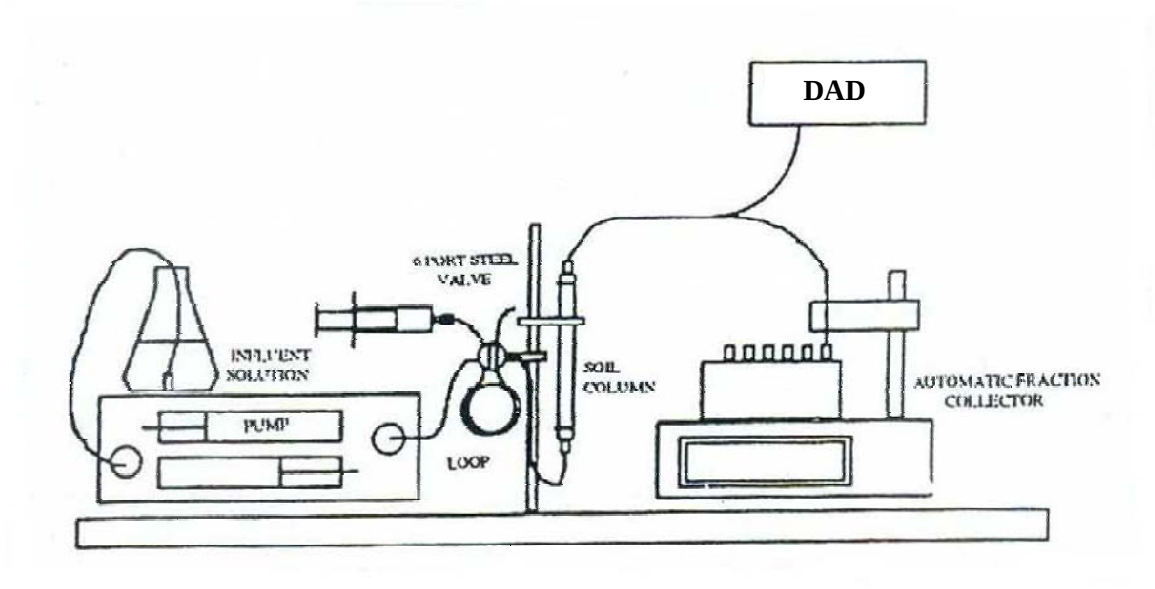


Figura 5.4. Dispositiu experimental per als estudis en columna de sòl.

5.2.8. ESTUDI DE CAMP

En aquest estudi s'aplicarà l'herbicida comercial Bi-Hedonal® (els components actius del qual són 2,4-D i MCPA) ja que és el que s'aplica habitualment a la gespa del camp de golf "*Serres de Pals*" per tal d'eliminar les males herbes en la gespa. És un herbicida hormonal per al control post-emergència de males herbes de fulla ampla emprat en diferents conreus com cereals i també en camps de golf. El transport de l'herbicida a través del sòl vindrà molt influït pel reg. En el nostre cas, totes aquestes condicions del sòl les intentarem tenir reflectides amb les dades que ens aportarà una parcel·la instrumentada que s'explicarà més endavant. Pel que fa a les condicions de reg, la gespa del camp de golf és regada diàriament amb aigua depurada provinent de l'EDAR Pals situada just al costat del camp.

Per tal de realitzar l'estudi es disposen dues parcel·les situades en el camp de golf. Una primera instrumentada ens permetrà obtenir mesures d'humitat, densitat i permeabilitat entre d'altres; una segona parcel·la on s'aplicarà l'herbicida comercial Bi-Hedonal®.

La parcel·la instrumentada de 20 m^2 està equipada amb tres TDR ("*Time Domain Reflectometry*") de 2 metres de longitud, alineats en la part central per tal de mesurar perfils d'humitat del terreny, vuit tensiòmetres, situats per duplicat a les vores de la parcel·la a 30, 60, 90 i 120 cm de profunditat, per mesurar la succió del terreny a diferents profunditats, i sis càpsules de succió per mostrejar aigua de la zona no saturada. Cal insistir que de la parcel·la instrumentada es recull informació que serà complementària a tot el treball realitzat al laboratori. La presa de mostres de la parcel·la instrumentada es realitzà agafant sempre dos perfils amb diferents profunditats de mostres de sòl per tenir replicats en les mesures d'humitat, densitat i permeabilitat.

En l'altra parcel·la es realitza una aplicació controlada del producte comercial Bi-Hedonal® en una superfície de 100 m^2 (10x10 m) del camp de golf en data 05-11-02 (**Figura 5.5**). Per fer una aplicació uniforme del producte, es va dividir la parcel·la en 10 subparcel·les de 10 m^2 (5x2 m). En cada subparcel·la es van dispersar de forma homogènia 10 litres de solució aquosa d'herbicida (0.2 $mL \cdot m^{-2}$ de Bi-Hedonal® (275 $g \cdot L^{-1}$ de 2,4-D i MCPA en forma de sal d'amina)). Per a l'aplicació del producte comercial es va utilitzar una regadora de 10 litres de capacitat màxima.

Figura 5.5. Parcel·la de mostreig del camp de golf "Serres de Pals". Es poden visualitzar les subparcel·les de 10 m^2 cadascuna.

A la **Figura 5.6** es mostren els punts de presa de mostra al llarg de tot el procés de mostreig. Periòdicament es procedeix a recollir mostres de sòl en dos punts diferents de la parcel·la per tal d'analitzar-les. Així, el primer dia de mostreig (coincideix amb el dia posterior a l'aplicació de l'herbicida Bi-Hedonal®) s'agafaren els punts A i B que es troben simètricament oposats. El tercer dia després de l'aplicació de l'herbicida s'agafen mostres de sòl en els punts C i D, i així successivament fins arribar al dia 70 després de l'aplicació de l'herbicida que s'agafen els punts U i V. Es finalitza el mostreig en el moment que ja no es detecta cap dels anàlits estudiats en cap mostra de sòl. La presa de mostra de sòl a cada punt es va realitzar a partir de la superfície de terreny, obtenint-se mostres alterades. Es recullen mostres a diferents profunditats en els punts seleccionats. Cada mostra de sòl es divideix en tres porcions equivalents. Una fracció es destina a l'anàlisi química, on es determina la concentració dels herbicides i els seus metabòlits fenòlics; una segona porció es destina a l'anàlisi microbiològica; la darrera porció s'utilitza per a la caracterització física del sòl (conjuntament amb les dades aportades

des de la parcel·la instrumentada). Les mostres destinades a la determinació dels herbicides i metabòlits fenòlics s'assequen a l'aire al laboratori i són tamisades a 2 mm. Llavors es procedeix a l'extracció dels herbicides i metabòlits fenòlics conjuntament. Concretament, 15 g de sòl s'extreuen amb 30 mL de NaOH 0.01 M. Els herbicides i metabòlits fenòlics en els extractes es determinen mitjançant el sistema HFSLM "*on-line*" desenvolupat al **Capítol 4.**

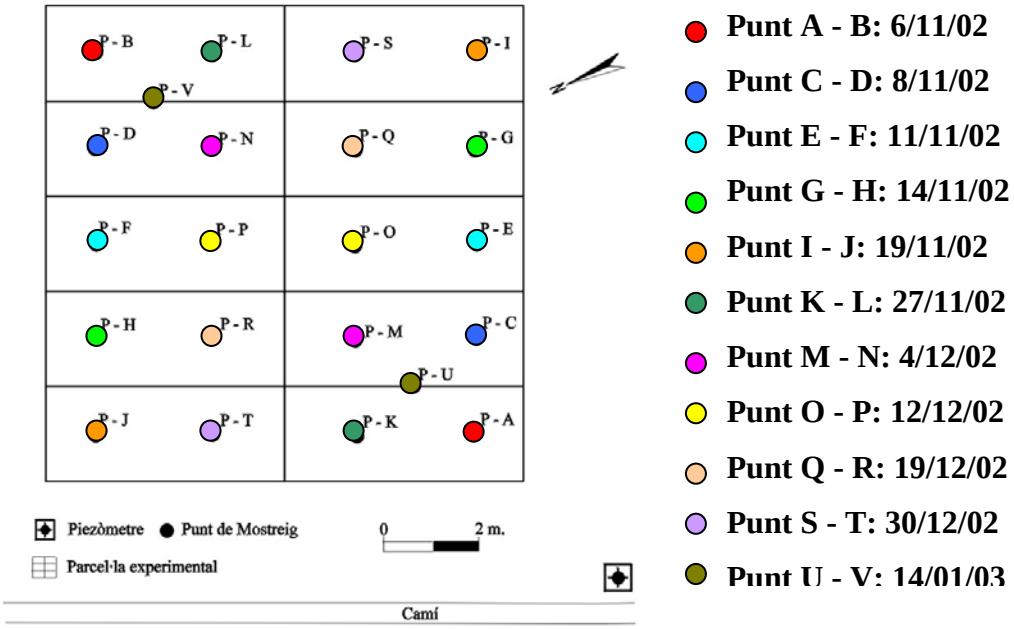


Figura 5.6. Esquema de la parcel·la de 100 m^2 on es mostren els punts de presa de mostra al llarg del temps.

Simultànimanet a l'aplicació del Bi-Hedonal®, s'aplica un traçador per poder fer el seguiment de les dos espècies a escala real. En aquest cas, s'escollí el triti com a traçador. L'anàlisi del triti no queda contemplat en aquest estudi, les mostres s'enviaren a un centre especialitzat en aquest tipus d'anàlisis.

Amb anterioritat a aquest estudi s'havia realitzat una aplicació anterior de Bi-Hedonal® en una altra parcel·la del camp de golf emprant bromur com a traçador. L'herbicida en aquest cas s'aplicà en la gespa amb una motxilla de fumigar a una concentració < 0.2 mL· m^{-2} de Bi-Hedonal®. El traçador escollit per aquell cas fou

bromur. En l'anàlisi posterior al laboratori hi hagué problemes tant en la determinació dels herbicides i els seus metabòlits fenòlics com del traçador. Les determinacions de bromur es realitzaren amb la col·laboració de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona mitjançant cromatografia iònica. La presència d'elevades quantitats de clorur a les mostres com a ió interferent va fer impossible poder quantificar el bromur. Pel que fa a les mostres de sòls destinades a la determinació de 2,4-D, MCPA (ingredients actius de l'herbicida comercial) i metabòlits fenòlics tampoc es trobaren resultats satisfactoris degut a múltiples causes. La primera causa estaria relacionada amb la forma d'aplicació de l'herbicida sobre la gespa. Amb la motxilla de fumigar no s'aconseguí un contacte tant eficient entre la barreja activa i el propi sòl (que es troba sota la capa de gespa). La segona causa seria la baixa concentració aplicada d'herbicida, quedant quantitats insuficients davant de la fracció que es perd per simple evaporació (fotodescomposició) abans no comença a interaccionar amb la primera fracció de sòl i pot anar-se transportant cap a nivells més profunds. Tots aquests problemes feren replantejar totes les etapes inicials de l'estudi de camp, repetint el procés per obtenir uns resultats satisfactoris.

5.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.3.1. CARACTERITZACIÓ DE L'ADSORCIÓ. ASSAIGS DE LABORATORI

L'objectiu d'aquest estudi és determinar els factors que controlen l'adsorció dels herbicides 2,4-D i MCPA en sòls provinents del camp de golf i els paràmetres cinètics que regulen el transport d'aquests contaminants.

5.3.1.1. Estudi en condicions d'equilibri. Experiments en discontinu ("*batch*")

S'estudia l'adsorció del 2,4-D i MCPA en sòls provinents del camp de golf "*Serres de Pals*". Aquests assaigs, permetran avaluar la capacitat d'adsorció, la influència de la relació sòl/concentració d'herbicida, l'adsorció en funció del temps i conèixer la capacitat efectiva d'aquests sòls per retenir contaminants.

S'han realitzat uns estudis cinètics preliminars per observar l'evolució de l'adsorció de cada compost al llarg del temps i determinar el temps de contacte necessari entre el sòl i el plaguicida per arribar a l'equilibri d'adsorció. Les gràfiques de la concentració relativa amb el temps per al 2,4-D i MCPA es mostren a la **Figura 5.7.** S'observa que s'arriba a l'equilibri d'adsorció per a 2,4-D a unes 24 hores de contacte amb el sòl, mentre que en el cas del MCPA només són necessàries unes 8 hores. La característica comuna és que a partir de les 24 hores ja no s'observa cap variació en la concentració dels dos herbicides en funció del temps. En cap de les dissolucions, inclús les corresponents a temps més llargs, s'ha observat la presència de metabòlits de 2,4-D i MCPA. A partir de les cinètiques realitzades s'estableix un temps d'agitació de 24 hores per als estudis de les isotermes d'adsorció per als dos herbicides.

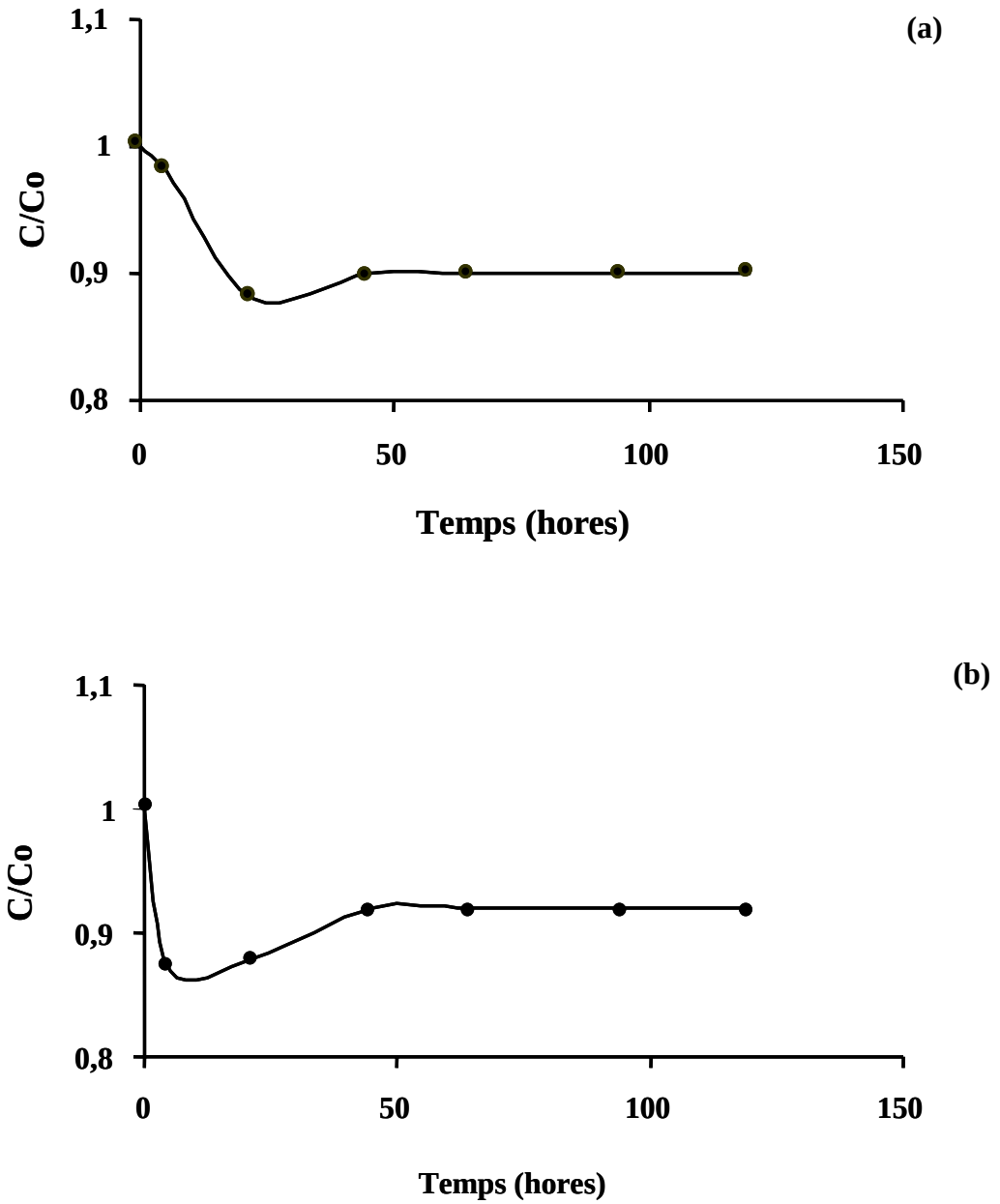


Figura 5.7. Cinètica d'adsorció de (a) 2,4-D (C_0= 2 μg·mL^{-1}) i (b) MCPA (C_o= 4 μg·mL^{-1}) amb un sòl de profunditat intermèdia .

Condicions experimentals: 5 g de sòl prèviament equilibrats amb 0.5 mM $CaCl_2$ es posen en contacte amb 20 mL de dissolucions de 2,4-D i MCPA en medi $CaCl_2$ 0.5 mM.

5.3.1.1.1. Adsorció de 2,4-D

Es determinen les isotermes d'adsorció amb mostres de sòl provinents del camp de golf corresponents a tres profunditats diferents (A: 0-10 cm, B: 30-60 cm i C: 60-120 cm), tal i com es mostra a la **Figura 5.8.** S'observa per als tres perfils de sòl que a mesura que augmenta la concentració de plaguicida a la dissolució augmenta de manera constant la quantitat de plaguicida adsorbit en el sòl. És la situació d'un mecanisme de partició on el plaguicida està distribuït entre el sòl i la dissolució sense cap interacció específica entre el 2,4-D i el sòl. El fet de presentar adsorcions baixes a concentracions petites indica la poca afinitat entre el sòl i el 2,4-D. Aquest comportament és característic de sòls molt porosos i per a compostos que no tenen l'afinitat i la geometria necessària per encabir-se a l'espai porós del sòl; i correspondria a una com isoterma tipus C [20,28]. El mateix comportament ha estat descrit per altres contaminants orgànics com fenols [20].

Les dades experimentals permeten extreure informació del coeficient de distribució de Freundlich del plaguicida entre la fase sòlida i la líquida (**Taula 5.3**) mitjançant l'ajust de les dades a un model de regressió no lineal del tipus $y=ax^b$ a on *a* és la constant d'adsorció de Freundlich (K_F) i *b* és 1/n.

Taula 5.3. Constants d'adsorció de Freundlich (K_F) i valors (*1/n*) per a les isotermes d'adsorció de 2,4-D i MCPA en sòls. R és el coeficient de correlació obtingut amb un model de regressió no lineal ($y=a\cdot x^b$). Els valors entre parèntesis corresponen a la desviació estàndard per als paràmetres calculats.

A: sòl superficial (0-30 cm de profunditat), B: sòl a profunditat intermèdia (30-60 cm), C: sòl nivell profund (60-120 cm)

Sòl	2,4-D			MCPA		
	K_F	*1/n*	R	K_F	*1/n*	R
A	0.84 (0.08)	1.16 (0.04)	0.9976	0.58 (0.11)	1.12 (0.08)	0.9922
B	0.54 (0.05)	1.02 (0.03)	0.9976	0.59 (0.15)	0.99 (0.10)	0.9778
C	0.86 (0.24)	0.93 (0.05)	0.9952	0.40 (0.09)	1.12 (0.09)	0.9907

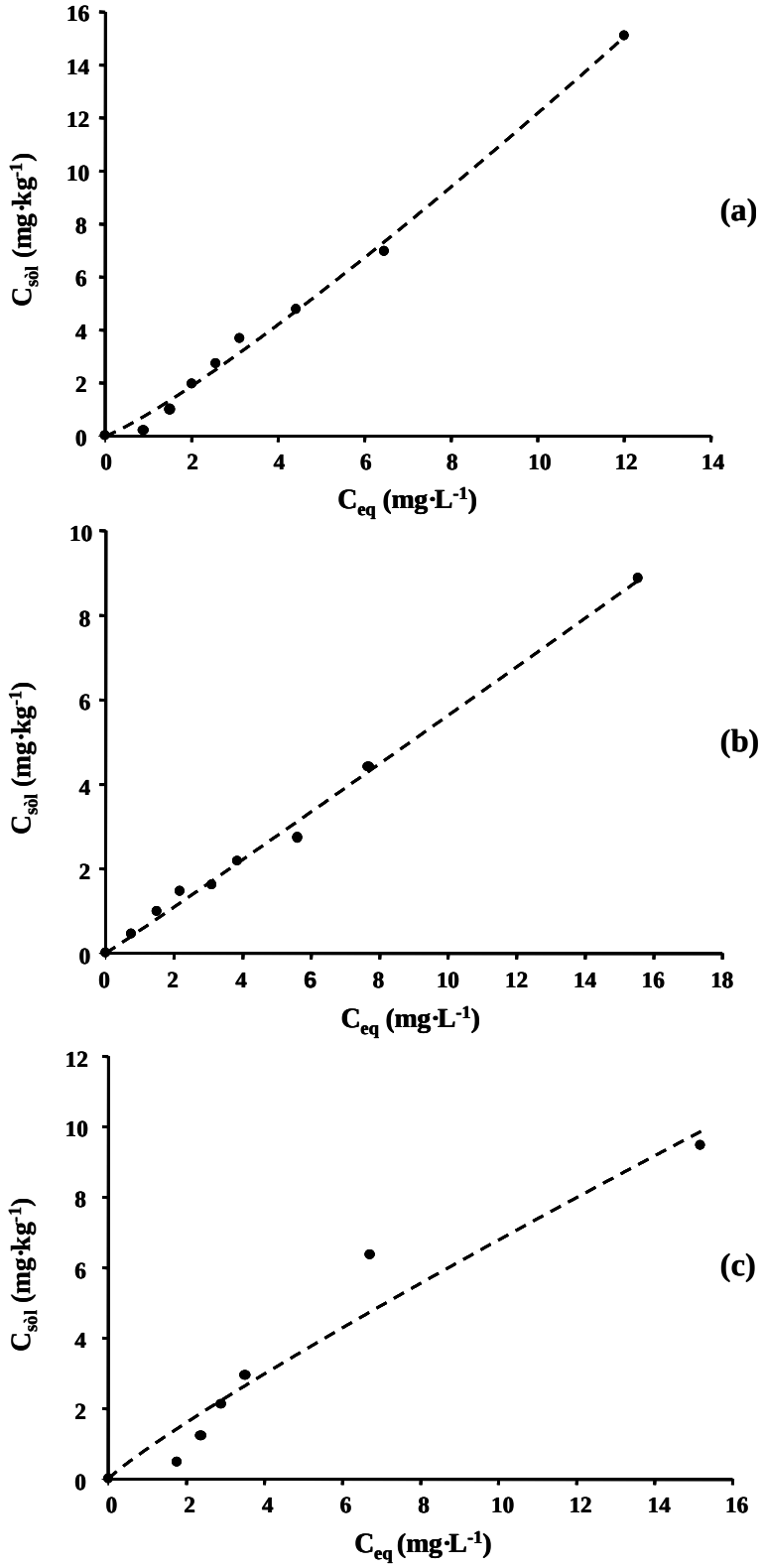


Figura 5.8. Isotermes d'adsorció de 2,4-D en sòls de diferents profunditats (a) sòl superficial, (b) sòl a profunditat intermèdia i (c) sòl a profunditat major. Les línies discontínues corresponen a l'ajust realitzat mitjançant un model no lineal ($y=a \cdot x^b$). Els experiments han estat realitzats posant en contacte 5 g de sòl amb 20 mL de dissolució del plaguicida.

L'adsorció de l'herbicida en el sòl ve condicionada, sobretot, per la presència de matèria orgànica, tal i com s'ha indicat amb anterioritat. No obstant, també es troba afectada per altres paràmetres com son la superfície del propi sòl on s'ha adsorbit, el tipus de matriu i el pH del sòl. Per tal d'avaluar el procés d'adsorció dels herbicides en el sòl és necessari caracteritzar tots aquests paràmetres. Els resultats de les anàlisis pel que fa a la matèria orgànica (veure **Taula 5.2**) mostren que els sòls superficials presenten uns percentatges de materia orgànica unes dos vegades superiors als valors obtinguts per als sòls a profunditat intermèdia. Els valors més elevats de matèria orgànica en els sòls superficials poden explicar els coeficients d'adsorció de Freundlich (K_F) superiors obtinguts per a aquest nivell. Encara que altres estudis indiquen l'existència d'una correlació de l'adsorció amb el contingut en minerals i no amb la matèria orgànica [29], els resultats obtinguts en aquest estudi mostren que, en aquest cas, aquesta correlació no existeix. La Taula 5.4 recull la composició mineralògica dels diferents sòls avaluats. Les mineralogies dominants en els sòls estudiats són el quars i la calcita. A més, cal destacar la important presència d'argiles (clorita, il·lita i caolinita), la suma de les quals supera moltes vegades el 25%.

Amb sòl corresponent a una profunditat major, la isoterma del 2,4-D mostra una forma tipus S que suggereix que l'afinitat de l'anàlit per les partícules de sòl és inferior que per la solució aquosa. Els resultats de la caracterització de les mostres de sòl mostren un increment en la densitat i una disminució en la porositat i contingut d'argiles i fangs en incrementar-se la profunditat, el que pot explicar la menor afinitat de l'anàlit cap a les partícules de sòl més profunds.

Taula 5.4. Composició mineralògica dels sòls estudiats. Anàlisis realitzats a l'Institut de Ciències de la terra "Jaume Almera" (C.S.I.C) mitjançant difracció de raigs X.

Prof. (cm)	% composició mineralògica								
	Clorita	Il·lita	Caolinita	Quars	Feldespat	Plagioclas	Hematites	Calcita	Dolomita
0	0	14	13	39	5	12	0	13	4
30	0	11	11	24	3	11	0	37	3
60	0	8	9	28	3	11	2	32	7
90	0	9	9	32	7	9	2	30	2
120	9	8	9	20	5	22	1	22	4
150	0	11	10	35	4	12	0	25	3
180	0	13	12	44	6	15	2	8	0
200	0	8	16	23	3	6	0	41	3

5.3.1.1.2. Adsorció de MCPA

Un cop determinades les isotermes d'adsorció per 2,4-D, s'ha estudiat el comportament del MCPA. A la **Figura 5.9** es mostren les isotermes obtingudes per a aquest herbicida amb sòls corresponents a les tres profunditats considerades. En tots els casos s'observa una isoterma de tipus S, el que representa un comportament diferenciat respecte al 2,4-D. La corba tipus S pot venir donada pel fet que les molècules de MCPA no presenten gaires forces intermoleculars i, en canvi, sí que mostren una gran força d'atracció pels llocs actius del sòl.

Els valors de K_F obtinguts per al sòl superficial i de profunditat intermèdia (**Taula 5.3**) no mostren diferències, mentre que disminueixen per als sòls més profunds. En general, els valors de les constants d'adsorció de Freundlich per al MCPA són inferiors que per al 2,4-D, el que indica que la capacitat d'adsorció d'aquests sòls per al MCPA són inferiors, tot i la cinètica d'adsorció més lenta del 2,4-D.

El diferent comportament d'adsorció dels dos herbicides fa pensar que, per geometria espaial, el 2,4-D pot ubicar-se des d'un principi en els punts actius del sòl en tenir una mida inferior. La presència d'un grup metil en el MCPA li impedeix encabir-se de forma adequada inicialment. L'obtenció d'isotermes tipus S sembla indicar que probablement es forma una monocapa sobre el sòl que torna a quedar saturada ràpidament.

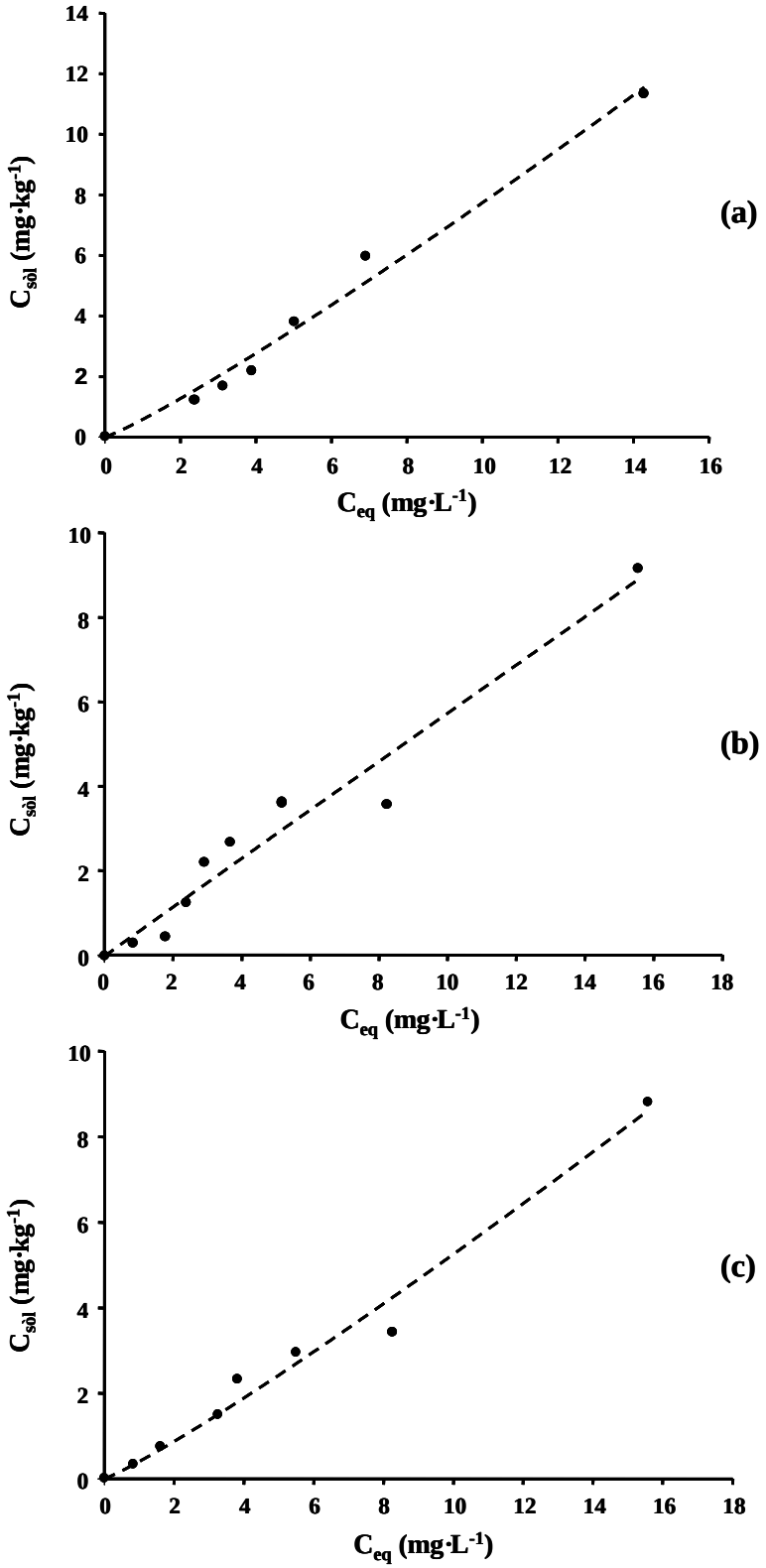


Figura 5.9. Isotermes d'adsorció de MCPA en sòls de diferents profunditats (a) sòl superficial, (b) sòl a profunditat intermèdia i (c) sòl a profunditat major. Les línies discontínues corresponen a l'ajust realitzat mitjançant el model no lineal ($y=a \cdot x^b$). Els experiments han estat realitzats posant en contacte 5 g de sòl amb 20 mL de dissolució del plaguicida.

5.3.1.1.3. Adsorció de 2,4-D i MCPA en competència

Donat que els dos herbicides, 2,4-D i MCPA, es troben presents conjuntament en el producte comercial s'ha cregut interessant estudiar l'adsorció dels dos compostos simultàniament. Primer s'ha realitzat un estudi amb una barreja sintètica dels dos compostos i després s'ha fet l'estudi emprant una dissolució preparada a partir de la formulació comercial Bi-Hedonal®. Els resultats han estat ajustats amb el model de Freundlich per un model de regressió no lineal ($y=a \cdot x^b$).

En el cas de la barreja sintètica només s'ha avaluat un sòl de profunditat intermèdia. Els valors calculats per a les constants de Freundlich són 1.25 i 0.72 per al 2,4-D i MCPA, respectivament. Per a la barreja a partir de la formulació comercial s'han estudiat les tres profunditats de sòl. Les constants de Freundlich determinades per al 2,4-D són 0.62, 0.44 i 0.47 per al sòl superficial, de profunditat intermèdia i més profund respectivament. Les constants per a MCPA són 0.77, 0.65 i 0.44.

La forma química de 2,4-D i MCPA difereix en el producte comercial i els patrons utilitzats. Així, mentre que en el producte comercial es troben en forma de sals d'amina, els patrons emprats són en forma àcida. Aquesta diferència de forma química és un factor rellevant alhora d'explicar les diferències de comportament en l'adsorció. A més, cal recordar que les formulacions comercials d'herbicides no només incorporen els ingredients actius necessaris sinó tota una sèrie de substàncies que faciliten els seu maneig, emmagatzematge i augmenten el seu grau de seguretat. Aquestes substàncies addicionades reben el nom d'adjuvants i poden ser de diferent tipologia: mullants (ingredients inactius), emulsionants, adherents, agents de fluïdesa, agents de suspensió, tamponadors de pH i activadors entre d'altres. Tots aquests aspectes fan que les condicions dels anàlits en el sòl no siguin idèntiques quan s'aplica el producte comercial i quan s'avaluen preparacions sintètiques preparades al laboratori per predir el comportament que pateixen al sòl, el que explica l'obtenció de resultats diferents.

No és gens conegut el destí de l'adjuvant després de l'aplicació de l'herbicida al sòl. Els adjuvants més típics són els no iònics tals com alcohols etoxilats i alquilamines etoxilades [30]. Backhaus et al. [31] han estudiat l'adsorció d'un adjuvant no iònic i l'anàlit 2,4-diclorofenol en un sòl individualment i de forma conjunta a diferents valors de pH. Un estudi amb 2,4-D és el realitzat per de Ruiter et al. [32] on han avaluat l'influència de dos adjuvants alquilamines etoxilades (Armoblen 557 i Ethomeen T/27) en l'eficàcia del 2,4-D en forma de sal d'amina per a no deixar crèixer una espècie en

concret de l'estudi. Conclouen que la combinació dels adjuvants amb el 2,4-D en forma de sal d'amina pot ser un bon successor de les formulacions més volàtils del 2,4-D en forma d'éster. A més, la presència dels dos adjuvants en la formulació del 2,4-D en forma de sal d'amina li fan baixar a aquest últim la fitotoxicitat.

Un altre aspecte a considerar és el fet que les isotermes d'adsorció són descripcions purament macroscòpiques i no permeten establir un mecanisme d'acció definitiu.

5.3.1.2. Assaigs en columna

En aquests experiments es treballa amb sistemes on el solut és afegit i eliminat contínuament del sistema. Aquests sistemes simulen d'una forma més adequada el transport sota condicions reals en el camp. Encara que els dos mètodes presentin avantatges i inconvenients, ambdós proporcionen informacions complementàries.

La columna d'acer inoxidable descrita a la secció experimental ha estat empaquetada amb mostres de sòl assecades a l'aire, corresponent a sòl d'una profunditat intermèdia de forma que s'obté una densitat propera a la real. A l'igual que en el cas dels experiments en discontinu, la columna de sòl es satura progressivament amb una solució electrolítica de $CaCl_2$ 0.5 mM fins aconseguir un flux constant (la saturació s'assoleix al cap d'unes 24 hores). A la **Taula 5.5** es mostra un resum de les principals característiques de la columna de sòl utilitzada.

Taula 5.5. Principals característiques de la columna de sòl.

Material de la columna	acer inoxidable	
Tipus d'experiment	Adsorció-Desorció	
Longitud de la columna, L (cm)	10.0	10.0
Diàmetre de la columna, d (cm)	2.0	2.0
Tipus de sòl	Intermedi (10-30 cm)	Superficial (0-10 cm)
Densitat de la partícula, ρ_p ($g \cdot cm^{-3}$)	2.66	2.66
Porositat, n ($cm^3 \cdot cm^{-3}$)	0.36	0.33
Índex de porus	0.56	0.49
Densitat sòl, ρ_s ($g \cdot cm^{-3}$)	1.70	1.69
Volum de porus, PV (cm^3)	11.3	3.32
Volum columna, V_c (cm^3)	31.41	31.41
Pes del sòl, W (g)	53.3	53.0

Flux: 0.05 $mL \cdot min^{-1}$.

Pes del sòl = densitat sòl · volum columna.

Un experiment típic en columna implica tres etapes principals. L'etapa inicial correspon a la injecció d'un pols de traçador dins la columna saturada amb l'objectiu de determinar la qualitat de l'empaquetament de la columna i les característiques de dispersió ja que aquest traçador és una espècie que no presenta adsorció. El traçador més utilitzat en aquest tipus d'experiments és l'ió bromur que habitualment és determinat per cromatografia iònica [33]. Aquesta determinació presenta problemes quan, com és el nostre cas, hi ha presència d'elevades concentracions d'ió clorur (l'electròlit utilitzat és $CaCl_2$). Per aquesta raó, en aquest estudi s'utilitza el pentafluorobenzoat sòdic (PFBNa) com a traçador, ja que permet un seguiment en continu mitjançant la seva absorció a l'UV sense interferències d'altres ions de la matriu. Una altra avantatge que presenta aquest traçador front el bromur és que té un tamany més similar a l'herbicida a utilitzar i això el fa més aconsellable per a l'estudi de transport a través de columnes de sòl.

El pentafluorobenzoat es prepara a partir de l'àcid 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoic amb l'addició de NaOH. A la **Figura 5.10** es mostra l'espectre UV per a aquest traçador en medi $CaCl_2$ 0.5 mM. Es pot observar que presenta un màxim d'absorció a 262 nm, per tant, es fa el seguiment del PFBNa fixant aquesta longitud d'ona. La metodologia experimental implica la injecció d'un pols de 100 μL de solució de traçador PFBNa 25 mM. El pols injectat és desplaçat a través de la columna amb solució de $CaCl_2$ 0.5 mM a un flux entre 0.04 i 0.06 $mL \cdot min^{-1}$. La solució de sortida és monitoritzada mitjançant mesures d'absorbància utilitzant un espectrofotòmetre de matriu de díodes.

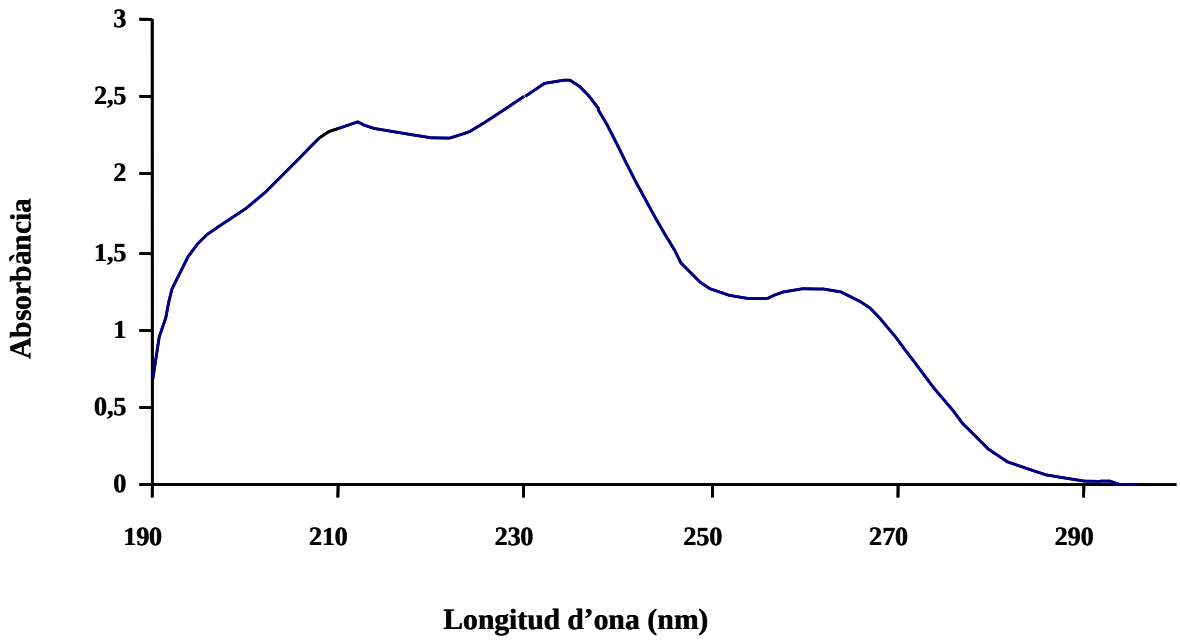


Figura 5.10. Espectre d'absorció UV de PFBNa (25 mM) en medi $CaCl_2$ 0.5 mM

A la **Figura 5.11** es mostra la corba corresponent al traçador per diferents velocitats de flux. L'absència de dobles pics indica que no hi ha camins preferencials. S'observa que per al flux més baix (0.04 $mL \cdot min^{-1}$) la cua és molt pronunciada, tardant més de 8

hores a recuperar l'anàlit, mentre que per al flux més elevat (0.06 mL·min^{-1}) amb 4 hores és suficient.

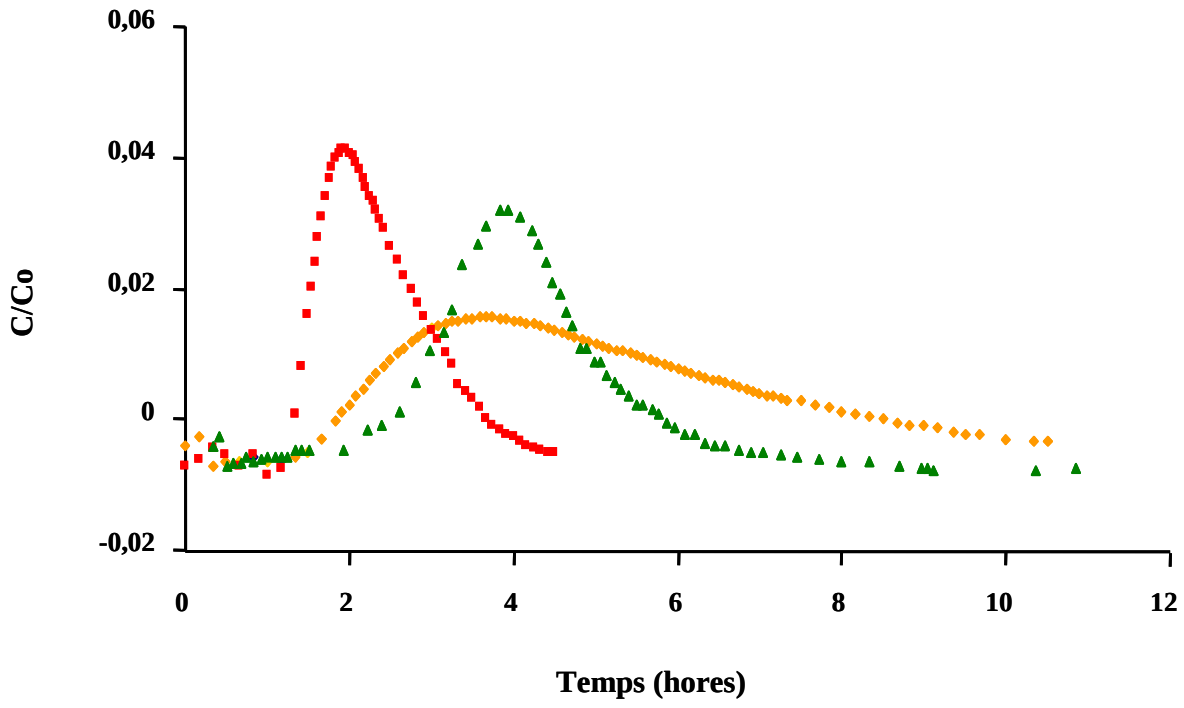


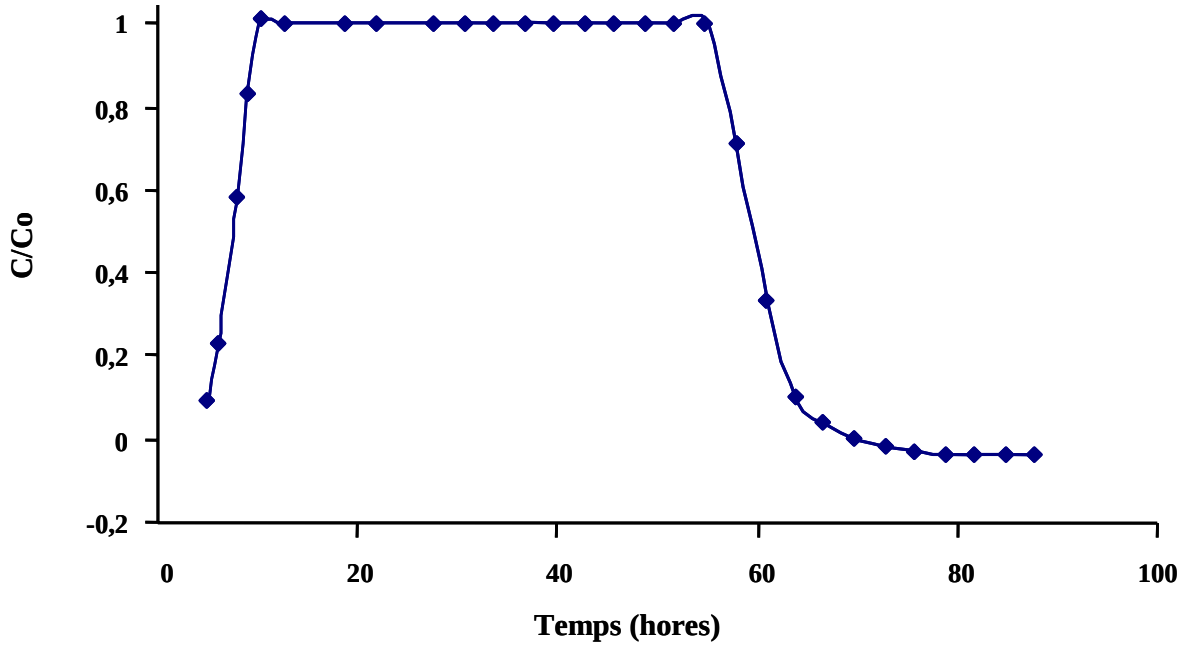
Figura 5.11. Assaig en columna amb PFBNa com a traçador per a un sòl de profunditat intermèdia a tres velocitats de flux diferents: 0.06 mL·min^{-1}, línia vermella; 0.05 mL·min^{-1}, línia verda; 0.04 mL·min^{-1}, línia taronja.

Es pot concloure que el PFBNa es comporta com un traçador conservatiu en la columna. Els resultats mostren que no té lloc l'adsorció, precipitació o d'exclusió aniònica durant el seu transport a través de la columna de sòl. La massa de PFBNa aplicada inicialment es correspon a la recuperada al final de l'experiment.

Un cop determinat que no hi ha camins preferencials dins de la columna, es programa el col·lector de fraccions d'acord amb les característiques de la columna i dels fluxos utilitzats en l'experiment amb el traçador. Llavors s'inicia la segona etapa amb la injecció contínua de 100 mL de solució d'herbicida (100 mg·L^{-1} de 2,4-D en $CaCl_2$ 0.5 mM) per la columna, seguit del pas de dissolució de $CaCl_2$ 0.5 mM. Després de la determinació de 2,4-D en cada alíquota, les concentracions s'expressen com concentracions relatives (C/C_0, on C i C_0 són les concentracions de sortida i d'entrada a la columna respectivament). A la **Figura 5.12** es mostra la representació de la

concentració relativa en funció del temps per a dos experiments en columna: un amb sòl superficial i de profunditat intermèdia.

(a)



(b)

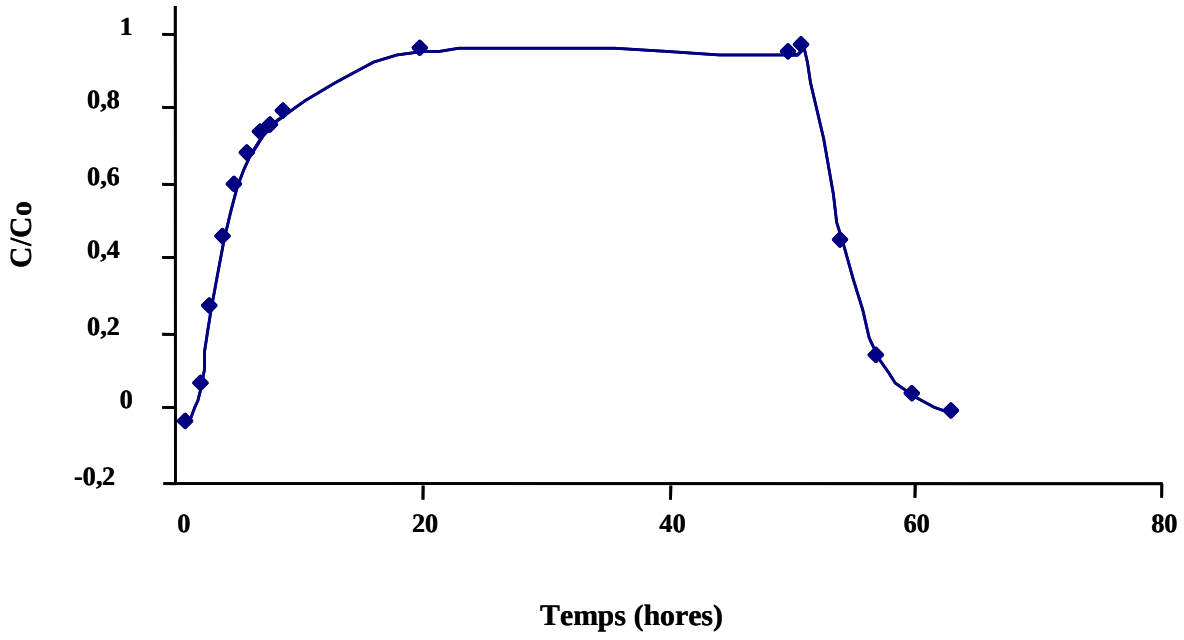


Figura 5.12. Corbes d'adsorció-desorció per a 2,4-D (100 mL a una concentració 100 μg/ml). (a) sòl a profunditat intermèdia (10-30 cm), (b) sòl superficial (0-10 cm). Flux = 0.05 mL·min^{-1}.

A les dues corbes es poden observar tres trams. Primer s'observa una adsorció lineal durant les primeres 10 hores fins arribar a la saturació. Un segon tram de saturació que es manté constant unes 40 hores. Finalment, un tercer tram on s'observa la davallada ocasionada per la desorció del 2,4-D de la columna. La forma de la corba sembla indicar l'existència de dos llocs d'adsorció diferents: un tipus d'adsorció entre el sòl i el plaguicida podria ser instantània, mentre que trobaríem un altre punt d'adsorció amb restriccions cinètiques a l'equilibri [26]. La desorció es realitza en 10 hores. Susarla et al. [13] estudien l'adsorció i la desorció per a 3 àcids fenoxiacètics i per a 3 clorofenols, en 1 aproximadament hora obtenen la desorció completa d'una columna de sòl volcànic per a tots els anàlits. Abate et al. [9] reporten que són necessàries 24 hores per a l'adsorció i 24 h més per a la desorció total de l'atrazina i els seus metabòlits. A la **Figura 5.13** es mostren les corbes corresponents al MCPA individual i a la coexistència de 2,4-D i MCPA en una mateixa columna. S'observa que la corba del MCPA té un tram de saturació més curt que en el cas del 2,4-D i que a partir de les 40 hores ja comença la desorció. Quan hi ha presència dels dos anàlits conjuntament dins la columna,la desorció del dos compostos s'inicia abans de 40 hores.

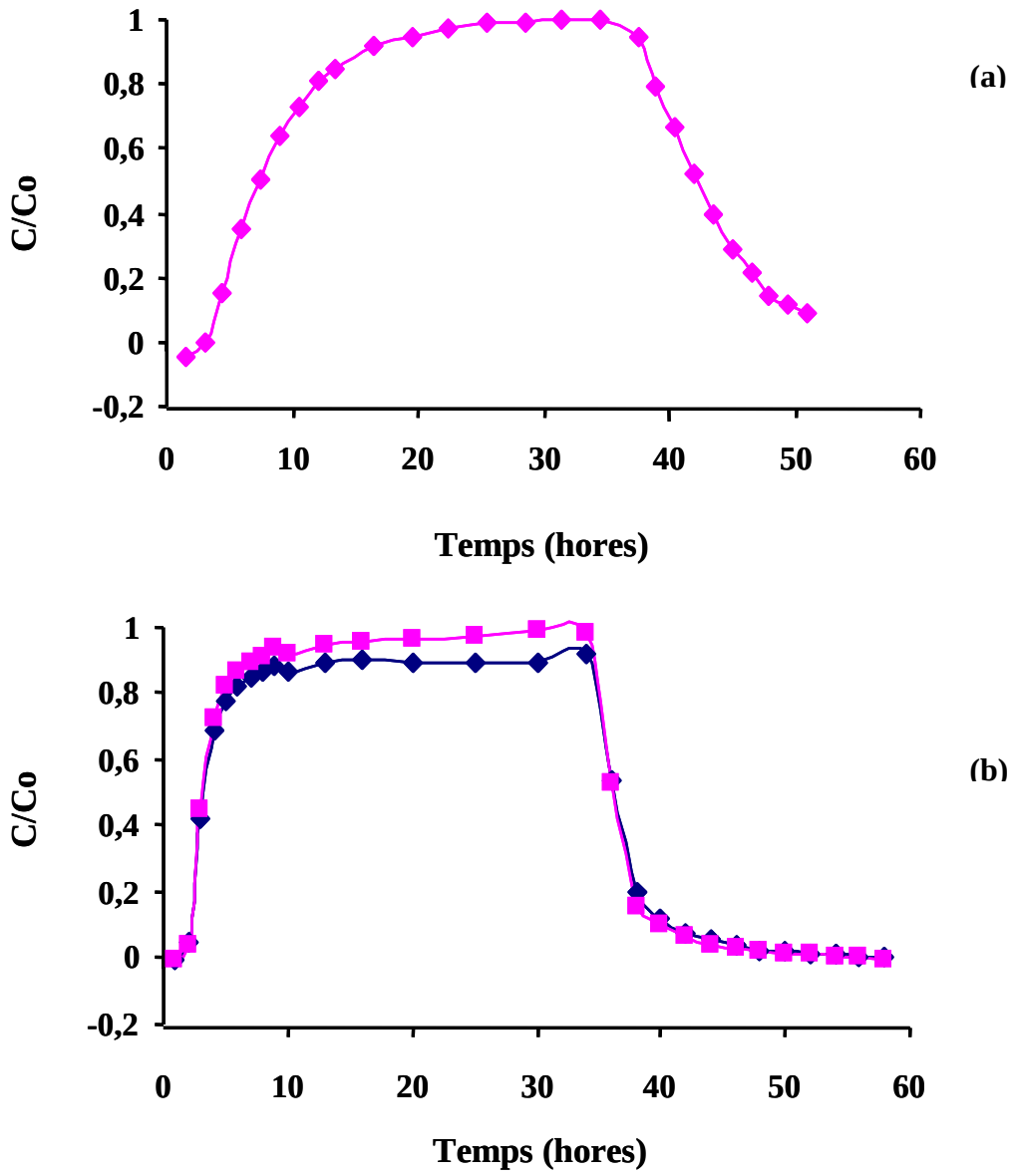


Figura 5.13. Corba d'adsorció-desorció per (a) MCPA (100 $\mu g \cdot mL^{-1}$) i (b) 2,4-D (línia blava) conjuntament amb MCPA (línia rosa), tots dos anàlits a 100 $\mu g \cdot L^{-1}$. Condicions experimentals: flux de 0.05 $mL \cdot min^{-1}$, sòl de profunditat intermèdia.

Els experiments realitzats en columna mostren les següents característiques generals:

- Adsorció similar del 2,4-D en sòl de profunditat intermèdia i en sòl superficial. Això indica que en condicions dinàmiques sembla que la diferència en el contingut de matèria orgànica dels dos sòls no es reflecteix en diferències apreciables en el comportament d'adsorció-desorció.

- L'adsorció del 2,4-D en aquests sòls no és un procés instantani, necessita un temps elevat per una equilibració òptima. Al mateix flux, la desorció és un procés més ràpid que l'adsorció.
- El 2,4-D presenta un temps de residència menor dins la columna quan es troba conjuntament amb MCPA.
- Comportament molt similar dels dos anàlits tant per l'adsorció com per la desorció. L'asimetria de les corbes pot ser atribuïda a l'existència de condicions de no-equilibri en la columna de sòl en flux.
- No s'han detectat metabòlits fenòlics ni en els experiments en "*batch*" ni en els de columna.

Pivetz et al. [34] també estudien el comportament del 2,4-D en columnes de sòl. Escullen el 2,4-D com a anàlit model per a assaigs en columna degut a la seva ràpida biodegradació (el bacteri "*Arthobacter*" converteix el 2,4-D per mitjà d'una conversió enzimàtica a derivats fenòlics). Aquests experiments han de servir com a base per a una modelització matemàtica de processos d'adsorció i degradació. Aquesta és una eina útil per predir el transport i el destí de contaminants en condicions reals [28]. No obstant, aquest estudi supera els objectius d'aquesta memòria i s'ha portat a terme en el Departament d'Enginyeria del Terreny de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

5.3.2. ESTUDI DE CAMP

Paral·lelament a l'estudi de laboratori es va dur a terme un estudi de camp. Aquest té com a objectiu obtenir informació del transport dels herbicides en condicions reals. Com ja s'ha descrit a l'apartat experimental, per realitzar l'estudi de camp en el camp de golf es disposa de dues parcel·les: una instrumentada i una altra preparada per a l'aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal®.

5.3.2.1 Parcel·la instrumentada

Primerament es mostren els resultats de les mesures realitzades en la parcel·la instrumentada. Cal tenir en compte que a part de les dades indicades a continuació, n'hi ha d'altres com la temperatura ambiental i els índexs de precipitació que poden influir

decisivament en el transport dels herbicides a través del sòl, incidint en una degradació i mobilitat més ràpida. Aquestes seran considerares condicions extrínseques a l'adsorció herbicida-sòl.

De la parcel·la instrumentada s'obtenen dades de granulometria i densitat del sòl. A nivell d'assaig granulomètric s'ha arribat a la conclusió que el percentatge de fins és molt important (>25%) en totes les mostres de sòl tractades. Per tant, es poden catalogar els sòls de la zona com a llim-arenosos. Els assaigs s'han realitzat segons la norma NLT-103/101. En un primer pas (després d'assecar la mostra a l'aire) es separa la fracció fina (inferior a 75 μm) de la grollera (superior a 75 μm), rentant la mostra. Després d'assecar les mostres a l'estufa es determina el percentatge de fins.

Pel que fa a la densitat, la **Figura 5.14** mostra que la densitat del sòl augmenta amb la profunditat. Aquest fet no és sorprenent si es té en compte que el sòl del camp de golf en realitat és "artificial" ja que s'ha alterat per construir els diferents elements (e.g. "*greens*" i turons). Dels dos perfils de sòl agafats per a l'estudi de la densitat, s'observa que oscil·la entre 1.20 i 1.55 g·cm^{-3} per a sòls superficials, a 1 m de profunditat la densitat es troba entre 1.7-1.8 g·cm^{-3}, passant a densitats pròximes a 2 g·cm^{-3} per a nivells més profunds.

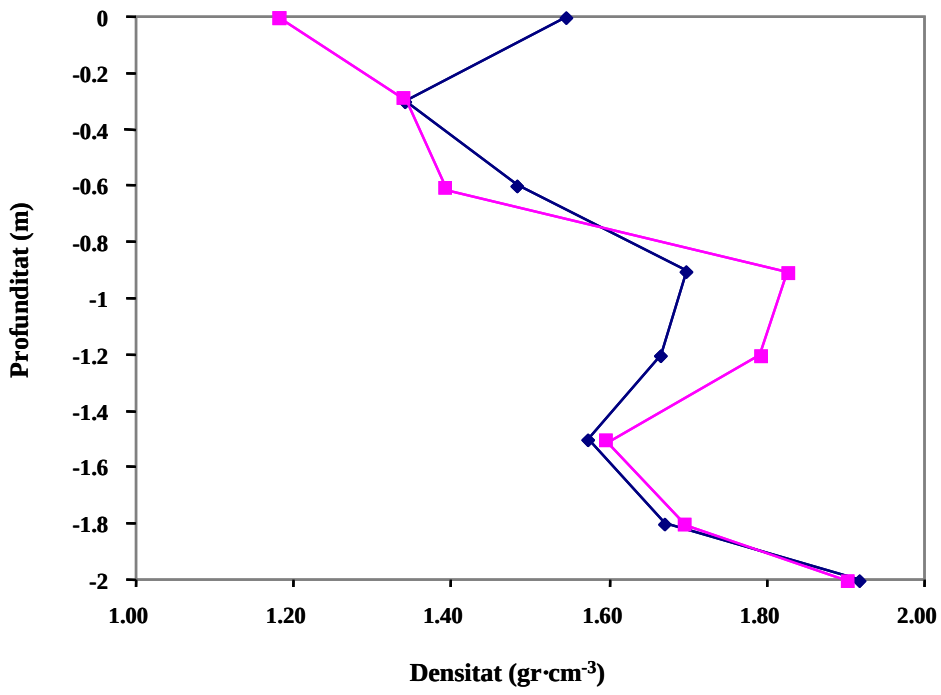


Figura 5.14. Densitat natural del sòl en funció de la profunditat (0-2m). La línia blava correspon al perfil 1 i la línia rosa correspon al perfil 2.

La densitat del sòl és un factor extrínsec a l'adsorció de l'anàlit en aquest, ja que quan més dens és un terreny menys mobilitat tindrà l'anàlit per moure's cap a horitzons més profunds. Cal avaluar la permeabilitat (K) del terreny per tal d'acotar quin tipus de mobilitat tindrà l'anàlit o anàlits objecte d'estudi. Per realitzar l'assaig de permeabilitat s'utilitzà un permeàmetre de càrrega variable segons la norma ASTM D 5084-90. Els resultats de l'anàlisi es mostren a la **Figura 5.15** on s'observa que la permeabilitat és major en els nivells superiors, on la densitat també és menor. Per tant, caldrà esperar una adsorció superior dels anàlits en zones més superficials dels sòl degut a l'alt contingut en matèria orgànica d'aquestes zones, però també caldrà esperar una mobilitat de l'anàlit cap a zones intermèdies ajudades per la baixa densitat i permeabilitat favorable.

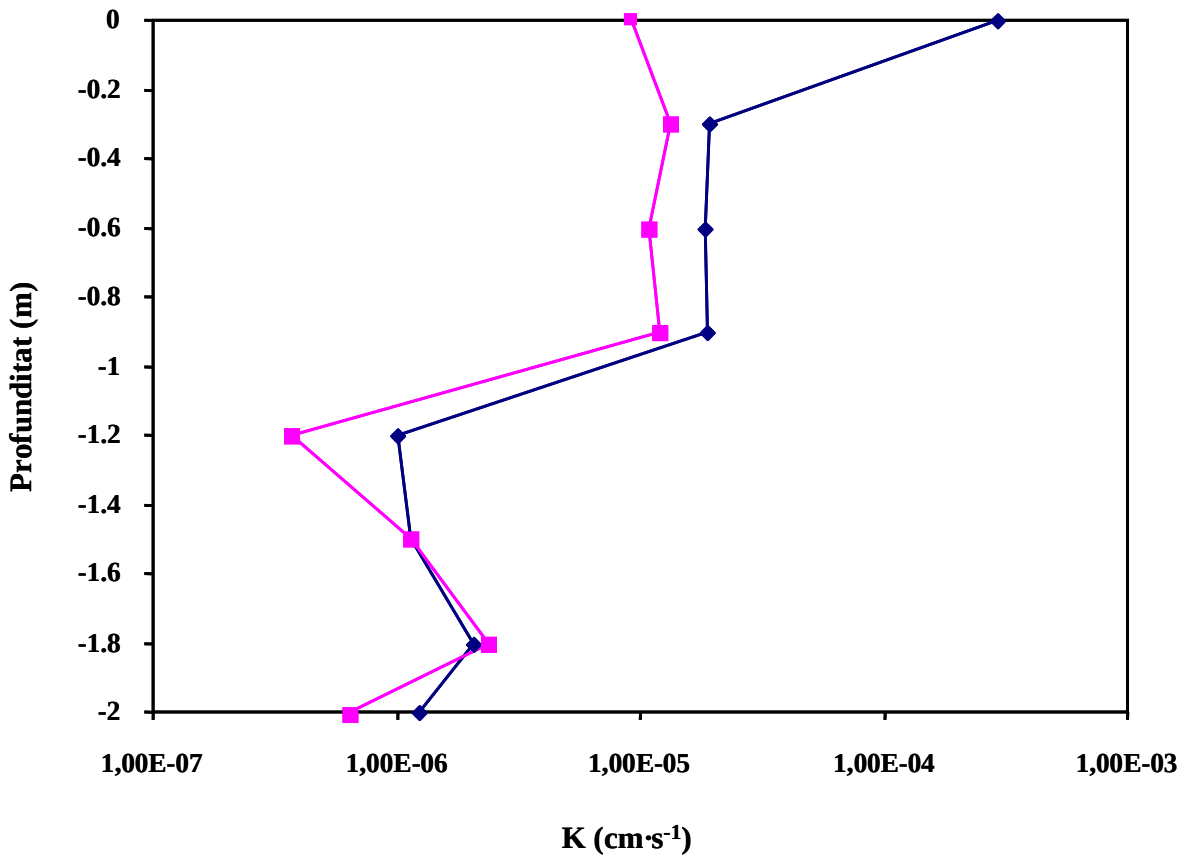


Figura 5.15. Permeabilitat saturada (K) en funció de la profunditat (0-2 m). La línia blava correspon al perfil 1 i la línia rosa correspon al perfil 2.

Un altre paràmetre important és la humitat del sòl. L'anàlisi de la variació del contingut d'humitat en el terreny es va controlar, directament en el terreny a partir de mesures de tensiòmetre i TDR (determinacions volumètriques) [35] i mitjançant mostreig de sòl i posterior determinació en el laboratori (determinacions gravimètriques). Tots els resultats obtinguts en els dos perfils oscil·len entre 1.0 i 1.9 $g \cdot cm^{-3}$. Els perfils d'humitat per als diferents dies de presa de mostra mostren una gran uniformitat del contingut d'humitat, donat que el regat en la gespa s'efectua de forma contínua (4 $mm \cdot m^{-2}$) durant tot l'any.

5.3.2.2. Aplicació de l'herbicida

Un cop caracteritzats els sòls a partir de les dades obtingudes a la parcel·la instrumentada, es procedeix a l'aplicació controlada del producte comercial Bi-Hedonal® en la parcel·la destinada exclusivament a l'aplicació de l'herbicida. Cal recordar que es realitzà una primera aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal® i de bromur com a traçador on no s'obtingueren resultats satisfactoris degut a la baixa quantitat d'herbicida aplicat i a la interferència de l'ió clorur sobre el bromur, tal i com s'ha detallat a la part experimental d'aquest capítol. Com que en la primera aplicació no s'aconseguiren els objectius a assolir, es va realitzar una segona aplicació l'any 2002 acotant millor els paràmetres que porten a una determinació adient de l'herbicida i els seus metabòlits fenòlics. També es va canviar el traçador de bromur per triti.

5.3.2.3. Anàlisi de sòls

Per a l'anàlisi de les mostres de sòl per a la determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics s'han desenvolupat les metodologies per la concentració dels anàlits descrites en els **Capítols 3** i **4**, extracció en fase sòlida i membrana líquida respectivament. A l'estudi de camp es decidí emprar el mètode de membranes líquides suportades ja que és la metodologia que dona millors resultats per a aquesta aplicació concreta (té uns límits de detecció en mostres de sòl inferiors). Pel que fa a la determinació de triti s'envien a un centre especialitzat quedant fora dels objectius d'aquest estudi.

El sistema de membrana líquida de fibra buida ("*hollow-fiber*", HFSLM) acoblat "*on-line*" a HPLC desenvolupat en el **Capítol 4** ha estat aplicat per fer el seguiment del

transport dels herbicides fenoxiacètics i els seus metabòlits fenòlics a través del sòl. Les mostres de sòl són obtingudes del camp de golf a diferents profunditats i diferents intervals de temps després de l'aplicació del producte comercial per estudiar la mobilitat i la degradació dels herbicides fenoxiacètics. Com ja s'ha indicat a l'apartat experimental, s'aplica una dissolució aquosa de l'herbicida comercial Bi-Hedonal® que conté 2,4-D i MCPA (27.5% p/v de cada component actiu) en forma de sal d'amina. La solució aquosa aplicada correspon a 0.2 mL de Bi-Hedonal® per m^2 de sòl.

En la **Figura 5.16** es mostren les concentracions determinades dels dos herbicides fenoxiacètics (2,4-D i MCPA) al llarg del període d'estudi. S'observa que en el sòl més superficial (0-10 cm) els nivells més elevats s'obtenen el primer dia després de l'aplicació (34.1 µg·kg $sòl^{-1}$ per al 2,4-D i 17.4 µg·kg $sòl^{-1}$ per al MCPA) i posteriorment. Es produeix una davallada important a partir del novè dia després de l'aplicació ja no s'observen disminucions destacables en els nivells dels dos anàlits i les concentracions detectades es mantenen entre 0.78 µg·kg $sòl^{-1}$ i 1.7 µg·kg $sòl^{-1}$ per a 2,4-D i 0.53 µg·kg $sòl^{-1}$ i 2.0 µg·kg $sòl^{-1}$ per a MCPA).

A la profunditat intermèdia (**Figura 5.16.b**) s'observa com en els primers dies després de l'aplicació encara no s'assoleix el màxim de concentració dels dos ingredients actius de l'herbicida (14.5 µg·kg $sòl^{-1}$ per a 2,4-D i 6.1 µg·kg $sòl^{-1}$ per a MCPA). Els nivells màxims es detecten el tercer dia després de l'aplicació, coincidint amb el descens que s'observa en sòls superficials (36.0 µg·kg $sòl^{-1}$ per a 2,4-D i 11.4 µg·kg $sòl^{-1}$ per a MCPA). Aquest fet és degut al transport ràpid del 2,4-D i MCPA des de la fracció més superficial a la intermèdia. A partir del sisè dia ja no es detecten els dos anàlits en la majoria dels casos (els valors mínims mostrats a la **Figura 5.16.b** corresponen als límits de detecció), suposant que s'han transportat a profunditats superiors o s'han degradat.

En les mostres de sòl corresponents a profunditat major (30-60 cm) no s'han detectat cap dels dos herbicides en les mostres analitzades (únicament a la mostra corresponent a 44 dies després de l'aplicació s'han detectat els dos compostos, però no s'ha pogut quantificar, en el sòl a nivell més profund). La dilució dels anàlits a mesura que es van difonent a través del sòl, conjuntament amb la seva degradació, explica perquè no és possible detectar-los en aquesta fracció. L'aplicació del producte comercial a concentracions més elevades ajudaria a detectar amb més facilitat els anàlits a tots els nivells de sòl, tal i com té lloc a l'estudi de Crespin et al. [19], on apliquen el mateix

producte comercial (Bi-Hedonal®) en una zona de conreu agrícola (la quantitat d'herbicida que apliquen és de 35 mL·m^{-2} en front dels 0.2 mL·m^{-2} aplicats en aquest estudi). No obstant, això implicaria emprar concentracions molt superior a les que s'utilitzen realment en el tractament al camp de golf i provocaria altres problemes (e.g. destrucció de la gespa per excés d'herbicida).

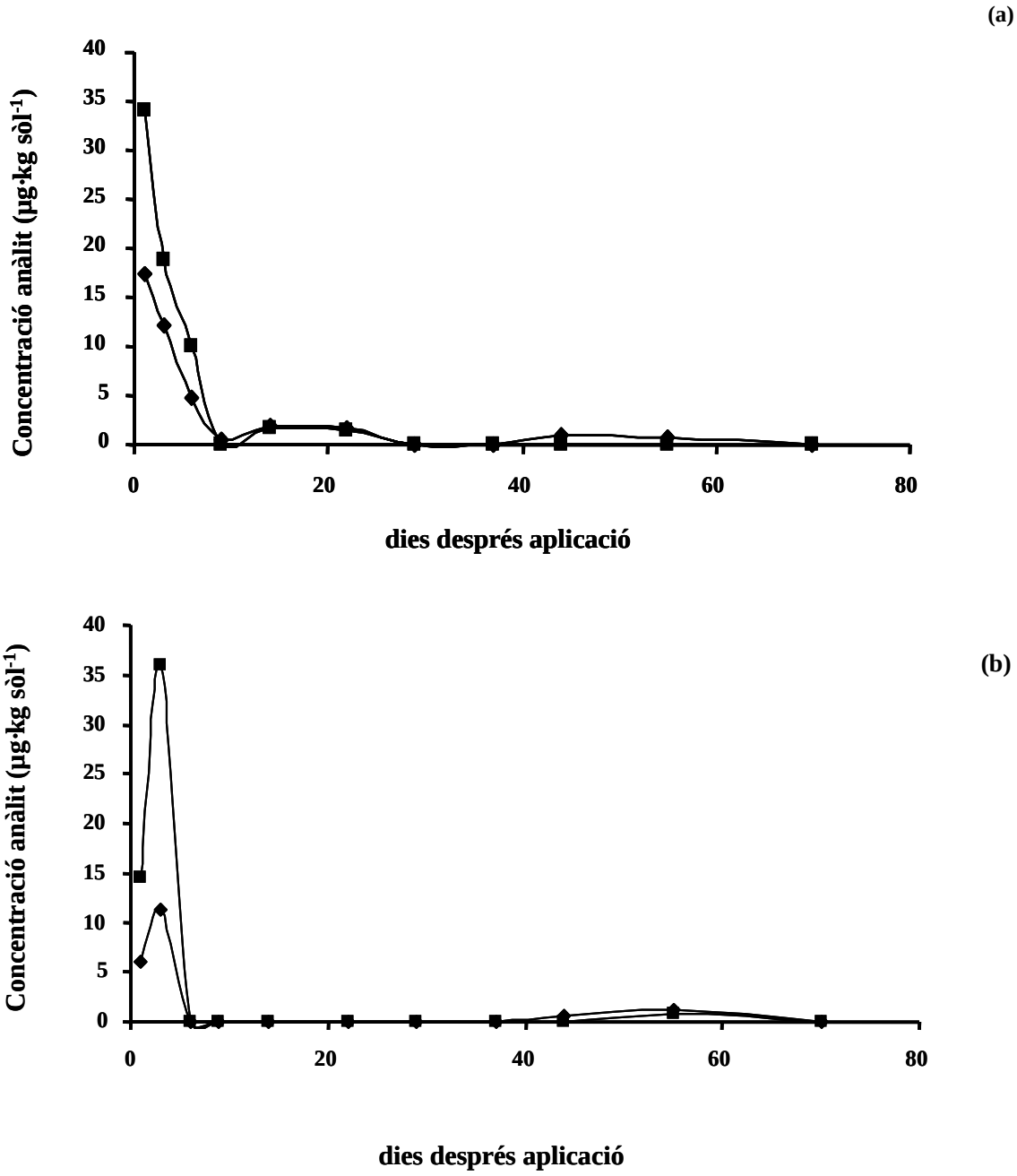


Figura 5.16. Distribució dels anàlits 2,4-D (quadrats) i MCPA (rombes) en sòls del camp de golf "Serres de Pals" a dos profunditats diferents (a) 0 a 10 cm i (b) 10 a 30 cm.

Una comparativa entre estudis amb diferents sòls i condicions d'humitat és molt complicada ja que aquests dos aspectes són determinatns per predir l'adsorció de l'herbicida. Huang et al. [8] troben en l'estudi de l'atrazina en tres tipus de sòl diferents que la matèria orgànica és el factor clau en l'adsorció de l'anàlit al sòl. Els percentatges de matèria orgànica en el sòl agrícola avaluat per Crespin et al. [19] oscil·len entre un 0.9 % el més superficial (0-10 cm) i un 1.2 % el més profund, incrementant el contingut a mesura que ens desplacem cap a sòls més profunds. En canvi, el contingut al sòl del camp de golf avaluat en aquest estudi oscil·la entre 2 $g \cdot cm^{-3}$ el més superficial, 1 $g \cdot cm^{-3}$ l'intermedi i 0.3 $g \cdot cm^{-3}$ el més profund, disminuint el contingut amb la profunditat, tot el contrari que a l'estudi anterior. La irrigació del sòl del camp de golf és un altre aspecte important a tenir en compte. En el cas del sòl del camp de golf, el reg és diari mentre que a l'estudi de Crespin et al. [19] irrigaven en dies puntuals, observant que són aquests dies d'irrigació on els anàlits es transporten cap a profunditats majors. La degradació del 2,4-D i MCPA als seus metabòlits fenòlics es mostra a la **Taula 5.6** on es recull la concentració determinada per a cada anàlit en funció del temps a partir de l'aplicació de l'herbicida comercial Bi-Hedonal®. Segons els resultats de la taula el 2-metilfenol (2-MP) i 2-clorofenol (2-CP) són els metabòlits fenòlics que es troben presents més sovint en les mostres de sòl des del primer dia després de l'aplicació fins a l'últim dia de mostreig. El 2-MP es troba a concentració màxima (13.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}) al sòl de profunditat intermèdia 14 dies després de l'aplicació de l'herbicida passant per concentracions inferios fins a 0.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} a profunditat de 30-60 cm el dia 70 després d'aplicació.

Pel que respecta al 2-CP es troba al valor màxim també a profunditat intermèdia el dia 55 després de l'aplicació amb un valor de 9.1 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}. Cal assenyalar que ja es quantifiquen 5 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} de 2-CP el dia 1 després de l'aplicació mentre que la concentració de 2-MP era de 0.5 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}.

El 4-CP agafa el seu valor màxim el dia 1 després de l'aplicació en el sòl més superficial (7.3 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}) fins a arribar a valors inferiors tals com 0.7 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} en sòl de profunditat intermèdia el dia 70 després de l'aplicació.

El 4-C-2-MP no es detecta en gairebé cap mostra ni els dies després de l'aplicació, només a l'inici de l'estudi (dia 1 i sòl superficial s'aprecien 6.8 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}). L'últim metabòlit, el 2,4-DCP, té un comportament molt similar al 4-C-2-MP, gairebé no el detecta al llarg de l'estudi, només es troba 6.0 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} de 2,4-DCP al sòl superficial el dia 1 després de l'aplicació de l'herbicida.

Taula 5.6. Concentracions determinades dels metabòlits fenòlics (2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) en sòls procedents del camp de golf "Serres de Pals" avaluats en aquest estudi.

Condicions experimentals: 15 g de sòl, extracció amb 30 mL de NaOH 0.01 M. Nomenclatura de les mostres de sòl: B (primer dia després aplicació), D (tercer dia després aplicació), F (sisè dia); H (novè dia); J (catorzè dia); L (22è dia); N (29è dia); P (37è dia); R (44è dia); T (55è dia); V (69è dia) i X (85è dia). 1: correspon a la fracció superficial (0-10 cm); 2: a la fracció intermèdia (10-30 cm); 3: a la fracció més profunda (30-60 cm).

Sòl	Concentració d'anàlit (μg·kg sòl^{-1})				
	2-MP	2-CP	4-CP	4-C-2-MP	2,4-DCP
B1	3.6	d	7.3	6.8	6.0
B2	0.5	5.0	d	d	1.0
B3	d	1.9	n.d	d	d
D1	d	2.4	d	n.d	n.d
D2	n.d	3.4	n.d	n.d	n.d
D3	n.d	6.4	n.d	n.d	n.d
F1	n.d	4.2	2.1	n.d	n.d
F2	n.d	4.8	2.1	n.d	n.d
F3	n.d	n.d	0.5	n.d	n.d
H1	n.d	1.6	0.9	n.d	n.d
H2	n.d	1.7	1.3	n.d	n.d
H3	n.d	1.0	d	n.d	n.d
J1	7.8	5.7	1.0	d	1.1
J2	13.4	7.2	0.4	n.d	n.d
J3	6.7	3.5	d	n.d	n.d
L1	8.8	4.0	n.d	n.d	n.d
L2	3.7	2.7	n.d	n.d	n.d
L3	3.5	2.2	n.d	n.d	n.d
N1	6.9	1.4	1.1	n.d	n.d
N2	6.3	d	0.9	n.d	n.d
N3	d	d	d	n.d	n.d
P1	7.0	0.9	0.6	n.d	n.d
P2	5.2	1.2	n.d	n.d	n.d
P3	3.6	1.2	1.2	n.d	n.d
R1	n.d	n.d	d	n.d	n.d
R2	n.d	d	d	n.d	1.1
R3	1.7	d	d	0.8	n.d
T1	0.7	d	d	d	n.d
T2	d	9.1	n.d	n.d	6.5
T3	d	4.4	d	1.6	n.d
V1	1.4	2.2	n.d	n.d	n.d
V2	0.5	1.5	d	d	n.d
V3	d	0.8	d	d	n.d
X1	1.1	2.5	2.0	d	n.d
X2	0.4	1.9	0.7	n.d	n.d
X3	d	2.5	d	n.d	d

d: detectat però per sota del límit de quantificació i n.d: no detectat.

Així doncs, hi ha dos tendències generals de comportament dels metabòlits fenòlics, mentre el grup de 2-MP, 2-CP i 4-CP són presents al llarg de tot l'estudi, el grup del 4-C-2-MP i 2,4-DCP només són quantificables en sòls superficials just després de l'aplicació.

Els herbicides fenoxiacètics es poden degradar en el sòl de dos formes, una abiòtica i una altra microbiològica [36]. En la forma abiòtica l'herbicida (en forma de sal d'amina) s'hidrolitza degut a la humitat donant lloc a anions fenoxiàcids o bé per fotodescomposició. La segona forma de degradació és més intensa i segueix una cinètica de primer ordre per al 2,4-D, essent influenciada per diferents factors com la concentració de l'herbicida, el contingut d'humitat del sòl, variables climàtiques i profunditat del sòl.

A més de l'acció microbiològica hi ha altres factors que influeixen en la degradació dels herbicides. En aquest estudi s'han acotat aquests factors al contingut d'humitat del sòl i a característiques tals com la densitat i la permeabilitat del sòl. Pel que fa al contingut en humitat del sòl cal fer notar que és un paràmetre molt constant ja que el regat de la gespa del camp de golf s'efectua de manera continuada el que afavoreix la mobilitat ràpida dels anàlits. En la **Figura 5.14** es mostrava com la densitat del sòl augmenta amb la profunditat. Aquest factor extrínsec dificulta que el 2,4-D i MCPA puguin desplaçar-se cap a nivells més profunds, facilitant la seva degradació. De la mateixa manera la permeabilitat és menor en sòls més profunds dificultant també que l'herbicida penetri a nivells més profunds.

Finalment, cal comparar aquests resultats de camp amb els resultats que s'havien obtingut per als experiments en discontinu de l'herbicida al laboratori. En la isoterma individual del 2,4-D ja s'havia observat una menor afinitat del 2,4-D cap a les partícules de sòl de nivells més profunds de sòl. Així, és lògic que en l'estudi de camp tampoc s'observi presència de 2,4-D en aquests nivells profunds. La constant d'adsorció del 2,4-D és superior a la del MCPA, i aquest fet coincideix, en general, amb els resultats de l'estudi de camp que sempre mostren una concentració més elevada de 2,4-D que de MCPA en els sòls de qualsevol nivell.

Els assaigs en columna també són una bona eina de predicció de l'estudi de camp. S'ha demostrat una disminució en els temps de residència dins la columna del 2,4-D quan es troba en presència de MCPA (passant a desorbir-se a les 40 hores en comptes de les 60 hores que necessita quan dins la columna no hi havia cap anàlit que

competeixi per les posicions d'adsorció del sòl). A més, els dos anàlits presenten corbes d'adsorció-desorció pràcticament idèntiques quan són introduïts a la columna conjuntament. És per això, que en l'estudi de camp s'espera obtenir un comportament similar d'adsorció i desorció dels dos anàlits al sòl, tal i com succeeix realment.

5.4. REFERÈNCIES

1. M. Seoanez, “Aguas Residuales Urbanas. Tratamientos naturales de bajo costo y aprovechamiento”, Mundi-Prensa, Madrid (Espanya), 1995, ISBN: 84-7114-545-6.
2. I. Bustamante, “El subsuelo como agente depurador de vertidos líquidos contaminantes”, Bol. Informaciones y estudios nº 49 M.O.P.U, Madrid (Espanya), 1988, ISBN: 84-7433-544-2.
3. S. Martínez, A. Sastre, “Evolución de las características químicas del agua recogida en la zona no saturada en una finca experimental regada con vinazas”,en (Alicante) “Hidrogeología y Recursos Hídricos”, 1992, 273. Proceedings del V Simposi de Hidrología.
4. C. Campos, “Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de agua residual regenerada en suelos”, (tesi doctoral), Facultat de Biologia, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona (Espanya), 2000, ISBN: 84-475-2252-0.
5. R.N. Yong, A.M.O. Mohamed, B.P. Warkentin, “Principles of Contaminant Transport in Soils”, Elsevier, Amsterdam (Holanda), 1996, ISBN: 0-444-89819
6. E. Pramauro, “Els pesticides i el medi ambient”, Servei de Publicacions, Universitat de València, València (Espanya), 1990, ISBN: 84-370-0680-5.
7. T. Crisanto, M.J. Sanchez-Martin, M. Sanchez-Camazano, Toxicol. Environ. Chem., 45 (1994), 97.
8. G. Huang, Q. Li, X. Zhang, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 71 (2003), 655.
9. G. Abate, J. C. Penteado, J.D. Cuzzi, G.C. Vitti, J. Lichtig, J.C. Masini, J. Agric. Food Chem., 52 (2004), 6747.
10. D. Ju, T.M. Young, Environ. Sci. Technol., 38 (2004), 5863.
11. Y. Ouyang, R.S. Mansell, P. Nkedi-Kizza, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 73 (2004), 725.
12. C. Ye, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 71 (2003), 919.
13. S. Susarla, S.M.R. Bhamidimarri, G.V. Bhaskar, Environ. Technol., 20 (1999), 1.
14. R.A.J. Grover, A.E. Smith, Can. J. Soil Sci., 54 (1974), 179.
15. W.G. Johnson, T.L. Lavy, E.E. Gbur, Weed Science, 43 (1995), 678.
16. R.G. Wilson, H.H. Cheng, Weed Science, 24 (1976), 461.
17. Z. M. Getenga, V. Madadi, S.O. Wandiga, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 72 (2004), 504.
18. G. Haberhauer, B. Temmel, M. H. Gerzabek, Chemosphere, 46 (2002), 495.
19. M.A. Crespin, M. Gallego, M. Valcarcel, J.L. Gonzalez, Environ. Science Technol. 35(21) (2001), 4265
20. C.H. Giles, T.H. MacEwan, S.N. Nakhwa, D. Smith, J. Chem. Soc., (1960) 3973.
21. D.G. Kinniburgh, Environ. Sci. technol., 20 (1986), 895.
22. K.E. Noll, V. Gounaris, W.-S. Hou, “Adsorption technology for air and water pollution control” Lewis Publishers, Chelsea MI (USA), 1992, ISBN 0-87371-340-0.
23. A.C.M. Bourg, “Adsorption of trace inorganic contaminants by solid particulate matter”, en “Aquatic ecotoxicology fundamental concepts and methodologies”, Vol. 1, A. Boudou, F. Bireyre (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL (USA), 1989, 107.
24. R. Calvet, Environ. Health Persp. 83 (1989), 145.

25. K.H. Tan, "Principles of soil chemistry", 2nd ed., Marcel Dekker (Ed.), Nova York, NY (USA), 1993, ISBN: 0-8247-8989-X.
26. J. Alvarez, A. Herguedas, J. Atienza, S. Bolado, "Modelización numérica y estimación de parámetros para la descripción del transporte de solutos en columnas de suelo en laboratorio", Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A), Monografías INIA nº 91, Madrid (Espanya), 1995, ISBN:
27. P.S.C. Rao, C.A. Bellin, M.L. Brusseau, "Coupling biodegradation of organic chemicals to sorption and transport in soils and aquifers: paradigms and paradoxes", en "Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil", D.M. Linn, T.H. Carski, M.L. Brusseau, F.H. Chang (Eds.), SSSA Special Publication nº 32, Madison, WI (USA), 1993, 1, ISBN: 0-89118-803-7.
28. D.L. Sparks, "Environmental Soil Chemistry", Academic Press, ciutat (país), 1995, ISBN: 0-12-656445-0.
29. D.A.V. Eckhardt, R.J. Wagenet, "Estimation of the potential for atrazine transport in a silt loam soil", en "Herbicide metabolites in surface water and groundwater", M.T. Meyer, E.M. Thurman (Eds.), ACS Symposium Series nº 630, Washington, DC (USA), 1996, 101, ISBN: 0-8412-3405-1.
30. K.A. Krogh, B. Halling-Sorensen, B.B. Mogensen, K.V. Vejrup, Chemosphere, 50 (2003), 871.
31. W.K. Backhaus, E. Klumpp, H-D. Narres, M.J. Schwuger, J. Colloid Int. Sci., 242 (2001), 6.
32. H. de Ruiter, K.R. Straatman, E. Meinen, J. Agric. Food Chem., 43 (1995), 3093.
33. H.F. Hemond, E.J. Fechner, "Chemical fate and transport in the environment", Elsevier, San Diego, CA (USA), 1994, ISBN: 0-12-340270-0.
34. B.E. Pivetz, T.S. Steenhuis, J. Environ. Qual., 24 (1995), 564.
35. K.H. Tan, "Environmental Soil Science", Marcel Dekker (Ed.), Nova York, NY (USA), 1994, ISBN: 0-8247-9198-3.
36. A.E. Smith, G.P. Lafond, "Effects of long-term phenoxyalkanoic acid herbicide field applications on the rate of microbial degradation" en "Enhanced biodegradation of pesticides in the environment", K.D. Racke, J.R. Coats (Eds.), American Chemical Society, Miami, FL (USA), 1990, ISBN:

CAPÍTOL 6

LA CAFEÏNA COM A MARCADOR DE LA CONTAMINACIÓ EN AIGÜES SUPERFICIALS I EN EL PROCÉS DE DEPURACIÓ D'AIGÜES RESIDUALS URBANES

CONTINGUTS CAPÍTOL 6:

6.1. INTRODUCCIÓ.....206

6.1.1. DETERMINACIÓ DE LA CAFEÏNA.....207
6.1.1.1 Cromatografia de gasos.....207
6.1.1.2 Cromatografia líquida.....207
6.1.1.3 Altres tècniques de determinació de cafeïna.....209
6.1.2. LA CAFEÏNA COM A MARCADOR DE CONTAMINACIÓ EN AIGÜES SUPERFICIALS DE LA COSTA BRAVA 209
6.1.3. LA CAFEÏNA EN EL PROCÉS DE DEPURACIÓ D'AIGÜES RESIDUALS.....213

6.2. EXPERIMENTAL.....220

6.2.1. REACTIUS.....220
6.2.2. DISSOLUCIONS.....220
6.2.3. APARELLS I MATERIALS.....220
6.2.4. PRESA DE MOSTRA 221
6.2.4.1. Aigües naturals.....221
6.2.4.2. Aigües residuals.....224
6.2.5. TRACTAMENT DE MOSTRA.....225
6.2.5.1. Extracció en fase sòlida, procés "*off-line*·".....226
6.2.5.2. Extracció en fase sòlida, procés "*on-line*".....226
6.2.6. MÈTODE CROMATOGRÀFIC D'ANÀLISI.....228

6.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....230

6.3.1. CARACTERITZACIÓ DEL MÈTODE CROMATOGRÀFIC.....230
6.3.1.1. Límit de detecció i de quantificació.....230
6.3.1.2. Interval lineal... 231
6.3.1.3. Altres paràmetres de qualitat.....232
6.3.2. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE SPE "*OFF*-LINE" PER A LA CAFEÏNA.....232
6.3.2.1. Volum de trencament.....233
6.3.2.2. Dissolvent d'elució.....234
6.3.2.3. Velocitat de càrrega.....235
6.3.2.4. Velocitat d'elució.....236
6.3.3. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE SPE-HPLC "*ON-LINE*" PER A LA CAFEÏNA.. 236
6.3.3.1. Capacitat d'extracció de la mini-columna (procés "*at-line*")..... 237
6.3.3.2. El procés SPE-HPLC "*on-line*": calibratge de la cafeïna.....239
6.3.4. MONITORITZACIÓ DE CAFEÏNA EN AIGÜES SUPERFICIALS DE LA COSTA BRAVA.....243
6.3.5. SEGUIMENT DE LA CAFEÏNA EN EL PROCÉS DE DEPURACIÓ D'AIGÜES RESIDUALS URBANES.....246

6.4. REFERÈNCIES.....249

6.1. INTRODUCCIÓ

Durant les últimes dècades, l'elevat nombre de compostos orgànics detectats a les aigües superficials ha provocat una preocupació important per la contaminació de les aigües. Una de les causes principals és que molts efluents urbans i industrials, contenint una gran varietat de contaminants inclús després del seu tractament, són abocats finalment a rius o llacs. Degut a que l'eliminació de contaminants per les plantes de tractament no és complet, a les aigües naturals arriben sovint molts compostos químics.

És necessari disposar de marcadors adequats per detectar i localitzar les fonts de la contaminació de l'aigua. El marcador ideal ha de permetre l'elucidació de la font de contaminació de manera inequívoca i la quantificació de la magnitud de la contaminació. Un consum regular i constant és un altre requeriment per a un bon marcador, la qual cosa implica que els hàbits de consum no canviïn. Finalment, les quantitats presents en les aigües residuals han de ser prou elevades per a permetre la seva quantificació després de la dispersió en el medi.

Els indicadors microbiològics com coliforms fecals s'han utilitzat tradicionalment per monitoritzar la contaminació d'aigües naturals per aigües residuals, però la seva fiabilitat ha estat qüestionada degut al seu curt temps de supervivència i la limitada especificitat de la font. Alternativament, s'han suggerit diferents marcadors químics com metabòlits endògens humans, constituents de fàrmacs o de productes d'higiene personal [1]. Els esteroides fecals presenten un ús limitat com a traçadors d'aigües residuals ja que hi ha altres fonts d'aquestes substàncies, com ara la ramaderia, indistingibles de la humana [2]. Pel que fa als compostos relacionats amb els tensioactius, com els nonilfenols, no només tenen com a font les aigües residuals domèstiques sinó que s'utilitzen en processos industrials i com a adjuvants en formulacions de plaguicides. La cafeïna i les fragàncies figuren entre els compostos amb característiques adients per a ser utilitzats com a marcadors de contaminació per a aigües residuals urbanes. La cafeïna és un bon marcador químic ja que les seves concentracions a l'aigua residual no tractada reflecteixen no només el consum, metabolisme i excreció del compost, sinó també la cafeïna provinent de begudes i aliments que s'han abocat directament, així com la degradació potencial en el sistema de clavegueram.

En aquest capítol s'estudia la presència de cafeïna en aigües naturals d'una zona de la Costa Brava per tal d'avaluar el possible impacte de les EDARs que aboquen part de les aigües tractades a aquestes aigües. Addicionalment, s'ha realitzat un seguiment d'aquest compost en les diferents etapes del procés de depuració d'aigües residuals en tres EDARs de característiques diferents de la mateixa zona.

6.1.1. DETERMINACIÓ DE LA CAFEÏNA

6.1.1.1. Cromatografia de gasos

La cafeïna ha estat determinada per GC/MS amb diferents objectius com l'anàlisi d'orina en els controls de dopatge [3,4] i la determinació conjunta amb fàrmacs en aigües residuals urbanes [5], en l'anàlisi en mostres que contenen cafeïna tals com fulles de tabac [6] i te [7], i com a marcador químic de la contaminació humana [8]. Un exemple de determinació de cafeïna, utilitzada com adulterant en la cocaïna, mitjançant GC/FID, el podem trobar en l'estudi de Prévide et al. [9], on es troben edulcorants inactius tals com sucres, carbonats i bicarbonats, però també es troba cafeïna en un 50.2 % de les mostres.

Shahar et al. [10] extreuen cafeïna de mostres d'orina humana mitjançant una desorció ràpida per làser i posterior anàlisi per GC/MS com a alternativa d'altres mètodes d'anàlisi més llargs i costosos. A més de proporcionar una extracció més ràpida es necessita un volum petit de mostra i s'aconsegueix un bon interval de linealitat i una bona reproduïbilitat. També s'ha determinat quantitativament la cafeïna mitjançant GC/MS en fulles d'*Ilex paraguariensis* [11], i juntament amb compostos bromats en mostres d'aigua de mar [12]. Staeb et al. [13] determinen cafeïna mitjançant GC/MS com a indicador del consum humà conjuntament amb altres substàncies indicatives tals com fragàncies, plaguicides i els seus productes de degradació, dissolvents industrials, agents complexants i agents antiespumants.

6.1.1.2. Cromatografia líquida

La cromatografia líquida s'ha utilitzat en estudis on es determina la cafeïna en mostres de te. Zuo et al. [14] descriuen un mètode de determinació simultània de cafeïna i àcid gàl·lic en les dues varietats de te verd existents. Existeixen mètodes ràpids per a la

determinació de cafeïna en les fulles de te per HPLC [15]. Nishitani et al. [16] determinen simultàniament catequines, cafeïna i altres compostos fenòlics en mostres de te mitjançant un mètode HPLC que utilitza un gradient format per aigua-metanol-acetat d'etil-àcid fosfòric. També s'ha utilitzat la cromatografia líquida amb detecció de masses amb interfase "*electrospray*" per a la determinació simultània de teïna, alcaloides i catequines en mostres de te [17].

Barbas et al. [18] validen un mètode per determinar cafeïna, 8-cloroteofil·lina i difenilhidramina en fàrmacs per HPLC amb una elució isocràtica dels compostos i detecció UV. Altres estudis de cafeïna en mostres d'analgèsics s'han realitzat mitjançant HPLC amb detecció amb matriu de díodes (DAD) [19]. La cafeïna s'ha determinat conjuntament amb teobromina en cacau i derivats del cacau mitjançant HPLC amb un sistema de "*clean-up*" que permet obtenir uns cromatogrames nets d'impureses [20].

En el cas de mostres biològiques s'ha determinat cafeïna en plasma humà conjuntament amb una sèrie de polifenols [21]. S'ha determinat cafeïna i teofil·lina conjuntament amb els seus metabòlits mitjançant LC/MS en plasma humà [22]. Una altra matriu biològica on s'ha determinat cafeïna mitjançant HPLC és l'orina [23]. A part de cafeïna s'han determinat 14 metabòlits, entre els quals trobem metilxantines i àcids dimetilúrics. Es realitza una extracció líquid-líquid dels compostos d'interès utilitzant una barreja cloroform:alcohol isopropílic (85:15, v/v) i en la separació cromatogràfica s'utilitza una fase mòbil consistent en una barreja 0.05% d'àcid acètic/alcohol metílic (92.5:7.5, v/v).

La cafeïna ha estat determinada en matrius aquoses tals com aigües residuals i aigua de riu. S'han detectat concentracions de cafeïna superiors a 147 $\mu g \cdot L^{-1}$ en aigües residuals urbanes a Alemanya [24]. S'ha determinat cafeïna en aigües superficials mitjançant LC/MS amb ionització química a pressió atmosfèrica. El mètode permet la determinació de la cafeïna a nivells inferiors a 4 $ng \cdot L^{-1}$. Tot i així, les mostres amb detecció positiva de cafeïna estan a valors de 41 $ng \cdot L^{-1}$ [25]. Batt et al [26] estudien la cafeïna conjuntament amb sis antibiòtics en aigua de riu tractada per LC/MS/MS.

Una variant de la cromatografia líquida és la cromatografia iònica que s'ha aplicat en la determinació de cafeïna conjuntament amb teobromina i teofil·lina en aliments i preparacions farmacèutiques [23,24].

6.1.1.3. Altres tècniques de determinació de cafeïna

No totes les determinacions de cafeïna es realitzen mitjançant tècniques cromatogràfiques. L'electroforesi capil·lar i les seves variants són tècniques habituals en la determinació de la cafeïna en diverses matrius. Lee et al. [27] comparen la determinació per HPLC i electroforesi capil·lar (CE) de catequines procedents de mostres de te i teoflavines. Conclouen que el temps d'anàlisi és tres vegades més ràpid per CE però, pel que fa a sensibilitat, la obtinguda per CE és cinc vegades menor que la que s'aconsegueix per HPLC. S'ha avaluat la cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC) per a la determinació de cafeïna de te de varietat verda (comuna) i una altra varietat molt beguda al Japó [28]. En general, s'ha utilitzat extensament l'electroforesi capil·lar en la determinació de cafeïna en moltes varietats de te [29-32] i begudes [33].

La determinació de cafeïna també s'ha realitzat mitjançant sensors, com el desenvolupat per Dorfner et al. [34] que s'aplica a un procés d'anàlisi industrial de control del torrat del cafè. També s'utilitzen multisensors en la determinació de cafeïna conjuntament amb dimenhidrinat i acetaminofen [35].

6.1.2. LA CAFEÏNA COM A MARCADOR QUÍMIC DE CONTAMINACIÓ EN AIGÜES SUPERFICIALS DE LA COSTA BRAVA

La zona on s'han desenvolupat els estudis que es presenten en aquest capítol es troba situada en la Costa Brava (franja litoral de la província de Girona). És una zona turística, la qual cosa comporta oscil·lacions poblacionals elevades. El Consorci de la Costa Brava (CCB) és un organisme supramunicipal que aplega els 27 municipis del litoral gironí i la Diputació de Girona, i que des de 1971 s'ocupa de la gestió del cicle de l'aigua, amb especial èmfasi en el sanejament i en el tractament de les aigües residual (des de l'abastiment de l'aigua potable fins a la depuració de les aigües residuals, on també hi actua l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA)). El Consorci de la Costa Brava és una de les institucions pioneres en el conjunt de l'Estat en el desenvolupament de projectes de reutilització d'aigües i amb un gran interès en la preservació de la qualitat de les mateixes.

En els darrers anys el CCB ha impulsat una sèrie d'estudis per tal de documentar la qualitat de l'aigua (des del punt de vista ecològic, microbiològic i químic) de diferents rieres de la zona i avaluar el seu estat ecològic, alhora que per generar

informació sobre l'impacte de les EDARs que aboquen part de les aigües tractades a aquestes rieres (una altra part de l'aigua tractada és subministrada per a diferents usos no potables, i la resta arriba directament a mar). Concretament es tracta de la Riera de Tossa, el riu Ridaura i la Riera Aubí. L'estat d'aquestes rieres també ha estat molt condicionat per l'activitat turística i urbanística que s'ha desenvolupat en la Costa Brava en les darreres dècades i que va portar en el passat a una sobreexplotació dels aqüífers i a un empitjorament de la qualitat de l'aigua. Malgrat les alteracions sofertes en la fase més crítica, les actuacions més recents realitzades en les seves conques han anat en línia de millorar tant determinats aspectes de l'abastament com del sanejament i de la reutilització, la qual cosa ha propiciat la recuperació de cabals naturals i de la qualitat ecològica.

En aquesta memòria es presenten únicament els resultats corresponents al seguiment de cafeïna com a marcador químic de contaminació per aigües residuals urbanes en les tres rieres esmentades. Aquest treball és una petita part d'un projecte més ampli, promogut pel Consorci de la Costa Brava en el qual es consideren diferents aspectes de qualitat química, microbiològica i ecològica de les aigües i en el qual estan implicats diferents agents.

La **Figura 6.1** mostra un mapa de la zona d'estudi amb la situació de les rieres. A continuació s'exposaran breument les seves característiques més rellevants.

Figura 6.1. Mapa de situació on es mostren les EDARs i els cursos d'aigua estudiats: Riera de Tossa, Riu Ridaura i Riera Aubí .

Riera de Tossa

La riera de Tossa és una típica riera mediterrània de curt recorregut i de cabals molt variables al llarg de l'any i d'un any a un altre, podent arribar a assecar-se pràcticament en els mesos d'estiu. Igual que passa amb la majoria de rieres, aquest assecatge és conseqüència de l'escassetat de precipitacions i de l'elevada evapotranspiració d'aquesta època, sent també afectada per les extraccions que es produeixen en els pous adjacents a la llera. L'any 1998 el mòdul de recuperació d'espais naturals i jardineria de l'Escola Taller del Consell Comarcal de la Selva va proposar la recuperació d'un terreny de 15000 m^2 situat al costat de la planta depuradora de Tossa i travessat per la riera de Tossa. Per fer-ne la recuperació es suggereix la reutilització de l'aigua regenerada per la planta depuradora, l'EDAR Tossa. Aquest ha estat un element clau en la millora ambiental de l'entorn ja que les aportacions d'aigua regenerada a través de la bassa del Parc de Sa Riera, que prèviament ja ha passat per un tractament terciari a l'EDAR Tossa, retornen un mínim cabal d'aigua a la riera. Per tal d'avaluar l'impacte potencial d'aquesta actuació, es va impulsar de del CCB un seguiment de la qualitat de l'aigua de la riera. Amb aquesta finalitat, es va seleccionar un punt situat aigües amunt de l' EDAR i un altre situat per sota de l'entrada de l'efluent de la bassa del Parc de Sa Riera. A més es van agafar mostres dels efluents secundaris i terciari de l'EDAR i del pou d'infiltració després de la bassa. A tots els punts es van mesurar variables fisicoquímiques i biològiques cada tres mesos, per obtenir informació de l'evolució al llarg de l'any (hivern, primavera, estiu i tardor).

Riu Ridaura

El Riu Ridaura és un riu temporani de règim mediterrani, amb crescudes a l'hivern i primavera i estiatge a l'estiu, accentuat per l'explotació de l'aqüífer. L'EDAR de Castell d'Aro dóna servei a aquest municipi i també als de Sant Feliu de Guíxols i de Santa Cristina d'Aro. Es tracta d'una EDAR de fangs activats convencional que tracta uns 8000 $m^3 \cdot dia^{-1}$ a l'hivern i uns 25000 $m^3 \cdot dia^{-1}$ a l'estiu. Aquesta instal·lació no està preparada per eliminar el nitrogen de l'aigua residual, ni tampoc per a la desinfecció de la totalitat de l'aigua tractada, que és abocada en part al mar a través d'un emissari submarí, i en part a la llera del Riu Ridaura. S'estima que per aquesta via s'evacuen uns 6000-8000 $m^3 \cdot dia^{-1}$, la qual cosa vol dir que a l'hivern la major part del cabal és abocat

al mar i que la sortida al Ridaura és relativament petita, mentre que a l'estiu la major part de l'aigua, aproximadament uns dos terços del total, són abocats a la llera del Ridaura. Aquest fet condiciona la qualitat del Riu Ridaura després del punt d'abocament de l'EDAR, especialment des del punt de vista de nutrients i de la qualitat microbiològica. L'any 2003 el CCB va iniciar una sèrie d'estudis per tal de documentar l'estat del riu avaluant la seva qualitat ecològica, química i microbiològica, i de generar informació sobre l'impacte de l'EDAR Castell d'Aro en el seu tram final, tant abans com després del punt d'abocament de l'EDAR. Aquests estudis s'han dut a terme durant el anys 2004 i 2005.

Riera Aubí

La riera Aubí té un curs d'aigua intermitent que es forma vora de la població de Palafrugell (Baix Empordà, Girona) i, a través de la fossa tectònica que entre els massissos de Begur i de les Gavarres uneix Palafrugell amb Palamós, es dirigeix a la mar. Desemboca vora Sant Antoni de Calonge. Aquesta riera sempre ha estat sotmesa a episodis periòdics de pèrdua de qualitat en l'aigua en el tram final. A l'estiu del 2003 es van realitzar dos campanyes de presa de mostra puntuals el setembre del 2003 i el juny del 2004. Al gener 2005 es va iniciar un seguiment sistemàtic de la qualitat de l'aigua d'aquesta riera per tal d'avaluar l'impacte sobre la qualitat de l'aigua de l'EDAR de Palamós, que aporta part de l'aigua tractada a aquesta riera.

6.1.3. LA CAFEÏNA EN EL PROCÉS DE DEPURACIÓ D'AIGÜES RESIDUALS

Les estacions depuradores d'aigües residuals (EDARs) són instal·lacions destinades a la purificació de les aigües residuals, urbanes o industrials, amb la finalitat de separar-ne els elements perjudicials o transformar-los de manera que l'aigua pugui tornar a ser abocada en un medi receptor.

Els processos de tractament que tenen lloc en les EDARs poden ser:

- Fisicoquímics, on la depuració es produeix mitjançant un tractament en el que s'addicionen reactius químics per afavorir la decantació dels sòlids en suspensió presents a l'aigua residual.

- Biològics, on la depuració té lloc mitjançant la intervenció dels microorganismes que actuen sobre la matèria orgànica i inorgànic (en suspensió, dissolta i col·loidal) present a l'aigua residual, transformant-la en sòlids sedimentables més fàcils de separar.

Per aconseguir una depuració més òptima, o en casos particulars, es poden combinar els dos tipus de depuració.

Com ja s'ha comentat a la introducció d'aquest capítol, i arrel de l'estudi de l'impacte de les EDARs en la qualitat de les aigües naturals, es va decidir aprofundir en el seguiment de la cafeïna en les diferents etapes del procés de tractament d'aigües residuals. Per aquesta finalitat s'han escollit tres EDARs amb diferents característiques: EDAR Empuriabrava, EDAR Pals i EDAR Palamós. A continuació es presenten les característiques més rellevants d'aquestes instal·lacions (informació facilitada pel Consorci de la Costa Brava).

EDAR Empuriabrava

L'EDAR Empuriabrava forma part del grup de plantes depuradores de nova generació, amb un sistema d'aiguamolls construïts (SAC) per tal de reutilitzar l'aigua tractada i donar sortida a una necessitat de la comarca com és l'abastament del "*Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà"* (PNAE) en èpoques de sequera, principalment a l'estiu. Inicialment la possibilitat d'abastiment dels aiguamolls era amb aigua del riu Muga, però l'entrada d'aigua marina en el tram final del riu hagués provocat la salinització dels pous de la zona. Per això es va considerar la possibilitat d'abastir les

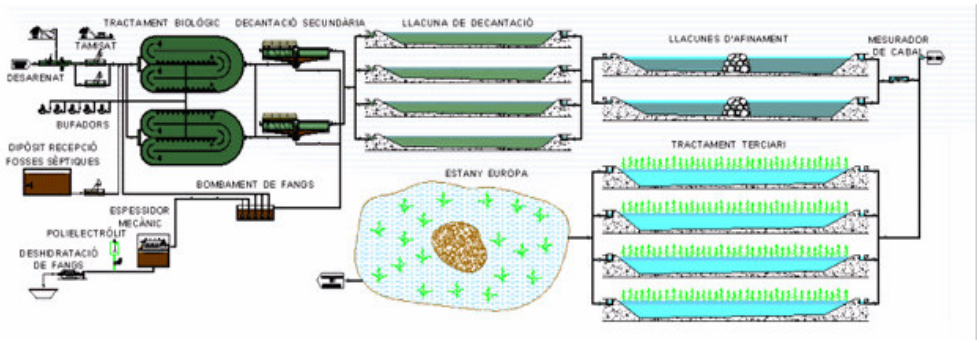
llacunes dels aiguamolls amb aigua depurada procedent de l'EDAR Empuriabrava. D'aquesta manera també es disminueix la gran quantitat d'efluent secundari abocat al riu Muga. La reutilització de l'aigua ha estat positiva per protegir la qualitat de l'aigua del riu en el seu trajecte final, així com també la qualitat de les aigües marines de la zona costanera. A la **Figura 6.2** es mostra una vista aèria de l'estació depuradora on a un costat s'observa el riu Muga desembocant a mar i a l'altra el *"Parc natural dels Aiguamolls de l'Empordà"*. Aquesta EDAR va començar a funcionar l'any 1995 i les característiques tècniques i de funcionament més importants es resumeixen a la **Taula 6.1**.

Figura 6.2. Vista aèria de l'EDAR d'Empuriabrava. A la fotografia s'observa la població d'Empuriabrava, el riu Muga i l'estació depuradora així com camps de conreu i els "*Aiguamolls de l'Empordà*". Imatge cedida pel "*Consorci Costa Brava*".

Taula 6.1. Principals característiques tècniques i de funcionament de l'EDAR Empuriabrava .

Destí efluent	Riu Muga, "*Parc Natural Aiguamolls Empordà*" i el camp de golf "*UpPitch & Put*" de Castelló Empúries	
Destí fang	Agricultura	
Superfície ocupada	49500 Ha	
Nombre de línies	2	
Tipus de procés	Llacunatge natural i airejat	
Cabal disseny	8750 $m^3 \cdot d^{-1}$	
Habitants equivalents	35000 habitants	
EBARs associades	EB Muga, EB Salins, EB Cortalet i EB Muga Aigua Depurada	
DBO_5	Entrada: 229 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 6 $mg \cdot L^{-1}$
DQO	Entrada: 550 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 56 $mg \cdot L^{-1}$
MES	Entrada: 257 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 10 $mg \cdot L^{-1}$
pH	Entrada: 7.40	Sortida: 7.70
Conductivitat	Entrada: 2.80 $dS.m^{-1}$	Sortida: 2.40 $dS.m^{-1}$
Nitrogen total	Entrada: 61.40 mg $N \cdot L^{-1}$	Sortida: 14.00 mg $N \cdot L^{-1}$
Fòsfor total	Entrada: 9.50 mg $P \cdot L^{-1}$	Sortida: 4.30 mg $P \cdot L^{-1}$

Diagrama:



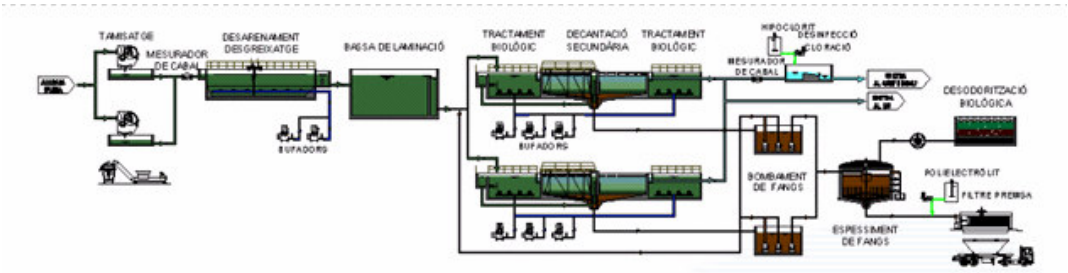
EDAR Pals

L'EDAR Pals és una planta depuradora de dimensions reduïdes que té al costat el camp de golf "Serres de Pals" al qual abasteix per al reg de la gespa. Una explicació més detallada d'aquesta EDAR en particular s'ha donat al **Capítol 5**. La **Figura 6.3** mostra una vista aèria de l'estació depuradora de Pals. Al costat hi ha l'embassament artificial utilitzat per al reg del camp de golf, també es veuen camps de conreu i les Illes Medes al fons. Aquesta EDAR va començar a funcionar l'any 1995. Les característiques tècniques i de funcionament més importants es resumeixen a la **Taula 6.2.**

Figura 6.3. Vista aèria de l'EDAR Pals. A la fotografia s'observa l'estació depuradora, així com l'embassament artificial del camp de golf per abastir el reg de gespa. Al fons s'observen camps de conreu i les Illes Medes. Imatge cedida pel "*Consorci Costa Brava*".

Taula 6.2. Principals característiques tècniques i de funcionament de l'EDAR Pals.

Destí efluent	Riera i Golf "*Serres de Pals*"	
Destí fang	Agricultura	
Superfície ocupada	0.14 Ha	
Nombre de línies	2	
Tipus de procés	Fangs activats	
Cabal disseny	6750 $m^3 \cdot d^{-1}$	
Habitants equivalents	27000 habitants	
EBARs associades	EB La Platja, EB Els Pins, EB El Golf, EB General, EB Casc Urbà i EB Sa Riera	
DBO_5	Entrada: 143 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 3 $mg \cdot L^{-1}$
DQO	Entrada: 288 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 41 $mg \cdot L^{-1}$
MES	Entrada: 174 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 5 $mg \cdot L^{-1}$
pH	Entrada: 7.90	Sortida: 7.45
Conductivitat	Entrada: 1.94 $dS.m^{-1}$	Sortida: 1.63 $dS.m^{-1}$
Nitrogen total	Entrada: 40.00 mg $N \cdot L^{-1}$	Sortida: 5.90 mg $N \cdot L^{-1}$
Fòsfor total	Entrada: 7.00 mg $P \cdot L^{-1}$	Sortida: 3.80 mg $P \cdot L^{-1}$
Diagrama:		



EDAR Palamós

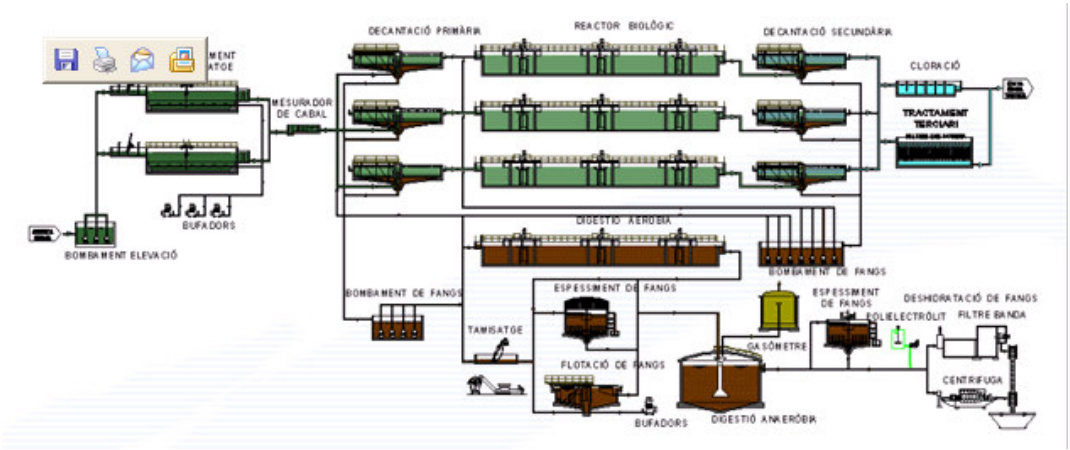
L'EDAR Palamós és la més antiga de les tres plantes estudiades i queda situada molt a prop de la riera d'Aubí. A la **Figura 6.4** es mostra una vista aèria de l'estació depuradora de Palamós, al costat de la població de Palamós i de la riera d'Aubí. Aquesta EDAR va començar a funcionar l'any 1985. Les característiques tècniques i de funcionament més importants es resumeixen a la **Taula 6.3.**

Figura 6.4. Vista aèria de l'EDAR Palamós. Imatge cedida pel "*Consorci Costa Brava*".

Taula 6.3. Principals característiques tècniques i de funcionament de l'EDAR Palamós.

Destí efluent	Mar, serveis municipals i reg pollancreda	
Destí fang	Agricultura	
Superfície ocupada	3.3 Ha	
Nombre de línies	3	
Tipus de procés	Fangs activats	
Cabal disseny	33000 $m^3 \cdot d^{-1}$	
Habitants equivalents	165450 habitants	
EBARs associades	EB Llafranc, EB Llofriu, EB La Fosca, EB Canadell entre d'altres	
DBO_5	Entrada: 191 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 8 $mg \cdot L^{-1}$
DQO	Entrada: 456 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 59 $mg \cdot L^{-1}$
MES	Entrada: 242 $mg \cdot L^{-1}$	Sortida: 32 $mg \cdot L^{-1}$
pH	Entrada: 8.00	Sortida: 7.80
Conductivitat	Entrada: 2.20 $dS.m^{-1}$	Sortida: 2.10 $dS.m^{-1}$
Nitrogen total	Entrada: 60.10 mg $N \cdot L^{-1}$	Sortida: 29.20 mg $N \cdot L^{-1}$
Fòsfor total	Entrada: 7.20 mg $P \cdot L^{-1}$	Sortida: 4.20 mg $P \cdot L^{-1}$

Diagrama:



6.2. EXPERIMENTAL

6.2.1. REACTIUS

- Cafeïna (1,3,7-trimetilxantina): sòlid, 99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya.
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.
- Metanol (CH_3OH): líquid, RS-Plus per a HPLC, Carlo-Erba, Milà, Itàlia.

6.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolucions estoc de cafeïna (c.a. 500, 100, 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua.
- Dissolucions de treball per dilució dels estocs en metanol, aigua o diverses proporcions de metanol:aigua segons convingui.

Totes les solucions es conserven refrigerades (4ºC). En aquestes condicions, les solucions estoc es poden conservar fins a un mes, mentre que les solucions de treball no més d'una setmana. Les mostres d'aigua residual són agafades de diferents punts (entrada, tractament biològic, decantador i sortida) de les depuradores objecte a estudi. Aquestes mostres es guarden a 4ºC fins a la seva anàlisi, previ filtratge per eliminar possibles partícules en suspensió.

6.2.3. APARELLS I MATERIALS

- Cromatògraf líquid Shimadzu (Kyoto, Japó) que incorpora un injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) amb bucle de 20 µL, 2 bombes LC-9A, detector UV-Visible SPD-6AV, registrador Chromatopac C-R6A, columna cromatogràfica de 20 cm x 0.46 cm i.d. empaquetada amb fase sílica Kromasil 100 C18 ODS (Teknokroma, Barcelona, Espanya). Per protegir la columna analítica es va emprar una precolumna ODS (TR-C-160-1, Teknokroma, Barcelona, Espanya). El flux de la fase mòbil és de 1 $mL \cdot min^{-1}$ i les anàlisis es realitzen a 25±1ºC.
- Xeringa per a HPLC de 100 µL (Hamilton, Bonaduz, Suïssa).

- Bomba peristàltica Minipuls 3 M312 (Gilson, Villiers Le Bel, França).
- Bany d'ultrasons (Selecta, Abrera, Espanya).
- Agitador rotatori (Dinko, Barcelona, Espanya).
- Sistema de filtració amb membrana de niló de 0.45 µm mida de porus (Whatman, Maidstone, UK).
- pHmetre GLP22 (Crison, Barcelona, Espanya).
- Balança analítica electrònica A200S amb precisió de ±0.1 mg (Sartorius Analytic, Göttingen, Alemanya).
- Sistema d'aigua ultrapura Milli-Q (Millipore Ibérica, Barcelona, Espanya).
- Cartutx de xeringa AccuBond II ODS: 500 mg de sorbent i 3 mL de volum (Agilent Technologies UK Ltd., West Lothian, UK).
- Cartutx de columna Accubond II ODS: 500 mg d'adsorbent de 546 $m^2 \cdot g^{-1}$d'àrea superficial, 6 mm de mida de porus i 3 mL de volum (Agilent Technologies UK Ltd., West Lothian, UK).
- Tub de tefló.
-

6.2.4. PRESA DE MOSTRA

Com ja s'ha indicat a les descripcions de les tres rieres i a les EDAR, es van agafar mostres d'aigües de diferents punts representatius abans i després de les EDAR pel que fa a les rieres i de diferents punts del procés de tractament en les plantes depuradores. Les mostres es prenen en ampolles de vidre i es conserven a 4ºC en arribar al laboratori.

6.2.4.1. Aigües naturals

Riera de Tossa

Per al seguiment de la cafeïna s'han seleccionat els punts següents:

- P1: riera de Tossa, pont abans de l'EDAR. UTM (x,y): (493690, 4620127).
- P2: riera de Tossa, pont de després de l'EDAR. UTM (x,y): (493925, 4619872).
- Efluent secundari EDAR Tossa.
- Efluent terciari EDAR Tossa.

- Aigua del pou d'infiltració.
- Bassa del Parc de Sa Riera.

A la **Figura 6.5** s'observa una vista del punt de la riera aigües avall de l'EDAR i el Parc de Sa Riera de Tossa.

a) **b)**

Figura 6.5. Imatges de la Riera de Tossa. a) situació del punt P2 avall EDAR, en el pont després de l'EDAR b) Parc de Sa Riera. Imatges cedida pel "*Consorci Costa Brava*".

Riu Ridaura

El punts escollits per a la presa de mostra en el seguiment de la cafeïna van ser els següents:

- P3: el Ridaura sota el pont de Tapioles aigües amunt EDAR). UTM (x,y): (497400, 4630950).
- P5: el Ridaura sota el pont del bicicarril (aigües avall de l'EDAR). UTM (x,y): (503200, 4628850).
- P5': el Ridaura sota el pont de la carretera de Sant Feliu de Guíxols. UTM (x,y): (504942, 4628768).
- Efluent secundari EDAR Castell-Platja d'Aro.
- Efluent terciari EDAR Castell-Platja d'Aro.

A la **Figura 6.6** es mostres les imatges dels punts situats al riu .

a) **b)** **c)**

Figura 6.6. Punts de presa de mostra en el riu Ridaura per al seguiment de la cafeïna en relació a l'EDAR Castell d'Aro. a) situació del punt P3 amunt EDAR sota el pont de Tapioles, b) situació del punt P5 avall EDAR, sota el pont del bicicarril i c) situació del punt P5' avall EDAR,sota el pont de la carretera de Sant Feliu de Guíxols. Imatges cedida pel "*Consorci Costa Brava*".

Riera Aubí

En el cas de la riera Aubí, els punts monitoritzats han estat els següents:

- P3: riera Aubí amunt EDAR, al pont prop d'on travessa el camí ral. UTM: (x,y): (0512376, 4637329).

- P4: riera Aubí avall EDAR, al pont prop de la platja de Castell. UTM: (x,y): (0512764, 4635239).

- P6: riera Aubí avall EDAR, tram ample abans de la desembocadura. UTM: (x,y): (0512952, 4635016).

- Efluent secundari EDAR Palamós.

- Efluent terciari EDAR Palamós.

A la **Figura 6.7** es mostren els tres punts de la riera

a) **b)** **c)**

Figura 6.7. Punts de presa de mostra en la riera d'Aubí per al seguiment de la cafeïna en relació a l'EDAR Palamós. a) situació del punt P3 amunt EDAR, al pont prop d'on travessa el camí ral, b) situació del punt P4 avall EDAR, al pont prop de la platja de Castell i c) situació del punt P6 avall EDAR, tram ample abans la bassa de la desembocadura. Imatges cedida pel "*Consorci Costa Brava*".

6.2.4.2. Aigües residuals

A la **Figura 6.8** es mostra la distribució de la planta depuradora d'Empuriabrava, situada al costat del riu Muga, i de la planta potabilitzadora (ETAP). Els punts de presa de mostra que s'han seleccionat en l'EDAR Empuriabrava són set, situats a l'entrada de l'aigua residual a la depuradora, al tractament biològic, al decantador, a la llacuna, a l'entrada dels SAC, a la sortida del SAC 1, a la sortida del SAC 2 i a la sortida del SAC 3.

Figura 6.8. Esquema EDAR Empuriabrava. (1) Tractament biològic, (2) Decantadors, (3) Decantadors, (4) Llacunes, (5) Sistema d'Aiguamolls Construïts (SAC), (6) Aiguamoll-llacuna Europa, (7) Tractament de fangs, (8) Derivatització cap als punts de tractament , (9) Entrada d'aigua residual a l'EDAR.

Els punts de presa de mostra seleccionats per l'EDAR Pals són tres, situats a l'entrada de l'aigua residual a l'EDAR, al tractament biològic i al decantador.

Els punts de presa de mostra seleccionats per l'EDAR Palamós són cinc, situats a l'entrada de l'aigua residual a l'EDAR, a la sortida del tractament primari, a un sistema de recirculació que condueix al tractament biològic, a un punt del decantador i a un punt del tractament terciari.

6.2.5. TRACTAMENT DE MOSTRA

Cada mostra es filtra a l'inici del procediment analític amb filtres de membrana de 0.45 µm per eliminar possibles partícules en suspensió. Com que la cafeïna es troba a concentracions molt baixes en les mostres procedents de les plantes depuradores, cal una etapa de concentració de la mostra prèvia a l'anàlisi. Així, la mostra es passa a través d'un cartutx d'extracció en fase sòlida per tal de concentrar i, alhora, tenir una etapa de "*clean-up*".

6.2.5.1. Extracció en fase sòlida, procés "*off-line*"

A continuació s'indiquen les etapes seguides en el procés de concentració i "*clean-up*" de les mostres en el procés d'extracció en fase sòlida, previ a l'anàlisi cromatogràfica:

(1) condicionament de l'adsorbent amb 2 mL de metanol i 2 mL d'aigua.

(2) aplicació de la mostra.

(3) assecat de l'adsorbent sota condicions de buit durant 30 s.

(4) desorció de la cafeïna amb metanol:aigua (diferents proporcions) o metanol.

(5) injecció directa de 20 µL de la dissolució d'elució a l'HPLC.

Com a adsorbent per a l'extracció en fase sòlida s'ha utilitzat una fase d'octadecil sílice comercial (AccuBond® C18). Les característiques principals d'aquest es resumeixen a la **Taula 6.4.**

Taula 6.4. Propietats de l'adsorbent AccuBond® C18 utilitzat per a l'extracció en fase sòlida de la cafeïna.

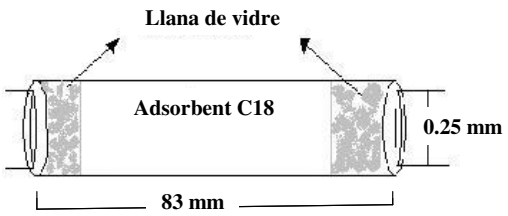
Cartutx ACCUBOND® C18	
Aspecte	Pols blanca
Porositat (Å)	60
Grup funcional	SiO_2-C18
Àrea superficial ($m^2 \cdot g^{-1}$)	546
Diàmetre de partícula (µm)	55
Pes adsorbent (mg)	500

6.2.5.2. Extracció en fase sòlida, procés "*on-line*"

Per tal d'augmentar els factors de preconcentració obtinguts inicialment pel mètode SPE "*off-line*", es dissenya una mini-columna farcida del mateix adsorbent acoblada "*on-line*" amb el sistema HPLC. Les característiques principals de la mini-columna queden resumides a la **Taula 6.5** on es pot veure un esquema de la mini-columna utilitzada.

Taula 6.5. Principals característiques de la mini-columna utilitzada en el sistema d'extracció en fase sòlida "*on-line*". En l'esquema de la mini-columna es pot veure que l'adsorbent C_{18} queda empaquetat entre dos taps de llana de vidre.

Mini-columna C_{18}		Esquema
Adsorbent	AccuBond C18	
Diàmetre intern (mm)	0.25	
Longitud (mm)	83	
Pes adsorbent (mg)	25-100	
Aspecte	Pols blanca	
Porositat (Å)	60	
Grup funcional	SiO_2-C_{18}	
Àrea superficial ($m^2 \cdot g^{-1}$)	546	
Diàmetre de partícula (µm)	55	



Les etapes seguides en el procés de concentració i "*clean-up*" i anàlisi de les mostres en el procés SPE "*on-line*" són:

(1) preparació de la mini-columna: es pesen amb la balança analítica els mil·ligrams d'adsorbent necessaris i s'introdueixen mitjançant aspiració al buit en un tub de tefló prèviament tancat amb llana de vidre per un costat. Un cop empaquetat es tanca l'altre extrem amb llana de vidre i es disposa dins el muntatge experimental com es veu a la **Figura 6.9.**

(2) condicionament de la mini-columna amb 1 mL de metanol i 1 mL d'aigua.

(3) aplicació de la mostra.

(4) assecat de l'adsorbent sota condicions de buit durant 30 s.

(5) desorció de la cafeïna amb metanol.

(6) El volum d'elució es dirigeix cap a la vàlvula injecció de l'HPLC i es procedeix a l'anàlisi cromatogràfica.

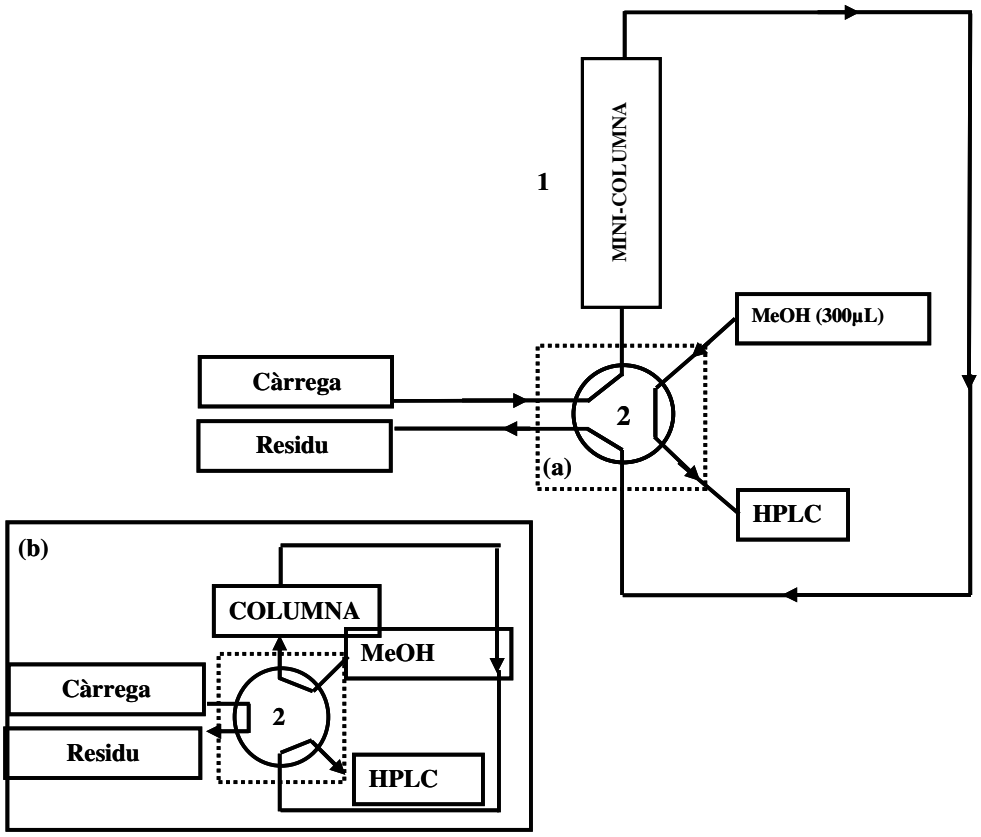


Figura 6.9. Diagrama esquemàtic del sistema SPE-HPLC utilitzat per a la determinació de cafeïna. 1: mini-columna 2: vàlvula de sis vies. (a) posició de la vàlvula durant l'etapa de concentració de la mostra. (b) posició de la vàlvula durant l'etapa de mesura.

6.2.6. MÈTODE CROMATOGRÀFIC D'ANÀLISI

Es selecciona la cromatografia líquida com a tècnica d'anàlisi ja que, tal i com s'ha comentat al **Capítol 3**, la metodologia SPE és més simple d'acoblar a HPLC que a GC. Les referències bibliogràfiques indiquen que la cafeïna pot ser determinada per HPLC en fase invertida, utilitzant una separació isocràtica amb una fase mòbil aigua:etanol:àcid acètic (75:24:1%, v/v/v) a un flux de 1 mL·min^{-1} [36]. D'altra banda la separació pot tenir lloc en gradient utilitzant entre 1-85% d'acetonitril en aigua en fluxos entre 1 i 1.5 mL·min^{-1} [37]. Considerant les dues metodologies s'opta per una separació isocràtica amb una fase mòbil d'acetonitril:aigua (20:80) a un flux de

1 mL·min^{-1}. La detecció es pot realitzar per UV, fixant la longitud d'ona analítica a 272 nm segons l'estudi [38].

En ser necessari preconcentrar les mostres d'aigua per SPE, s'ha de tenir en compte l'efecte del dissolvent d'elució utilitzat en l'elució de la cafeïna del sorbent SPE en la resolució i eficàcia del mètode cromatogràfic. Els dissolvents utilitzats per a aquesta etapa d'elució són metanol i barreges metanol:aigua. En l'avaluació d'aquests dissolvents i aigua com a solvents de la mostra injectada a l'HPLC no s'ha observat cap diferència en les amplades de pic ni en els temps de retenció de la cafeïna.

6.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.3.1. CARACTERITZACIÓ DEL MÈTODE CROMATOGRÀFIC

Per a caracteritzar el mètode HPLC emprat, s'han determinat l'interval de linealitat, el límit de quantificació i el límit de detecció per a la cafeïna d'aquest mètode en mostres d'aigües residuals d'origen urbà, així com altres paràmetres de qualitat.

6.3.1.1. Límit de detecció i de quantificació

La determinació del límit de detecció s'ha realitzat a partir de mesurar un nombre elevat de vegades un blanc (n>15) i calcular-ne la seva desviació estàndard (s_{bl}). En les tècniques cromatogràfiques no és possible obtenir un pic mesurable al temps de l'analit d'interès quan s'injecta un blanc. En aquests casos, la determinació de la desviació estàndard del blanc es pot realitzar a partir d'una sèrie d'injeccions d'una mostra contenint l'anàlit a una concentració propera al límit de detecció. El límit de detecció es determina a partir de la concentració corresponent a un senyal igual a $3 \cdot s_{bl}$. El càlcul del límit de quantificació es realitza seguint el mateix procediment que per al límit de detecció, tot i que en aquest cas es determina a partir de 10 vegades la desviació estàndard del blanc ($10 \cdot s_{bl}$).

El límit de detecció experimental de la cafeïna per al mètode HPLC emprat és de $1 \mu g \cdot L^{-1}$ (injecció de 20 µL de mostra), mentre que el límit de quantificació és de 4 $\mu g \cdot L^{-1}$. A la **Figura 6.10** s'observa el cromatograma corresponent a un patró de 5 $\mu g \cdot L^{-1}$ de cafeïna, una concentració just per sobre del límit de quantificació. S'observa que el pic corresponent a la cafeïna és clarament identificable i la seva alçada és significativament diferent del sorroll de fons com per ser quantificada, el que indica que la metodologia emprada per a la determinació dels límits de detecció i quantificació és adient.

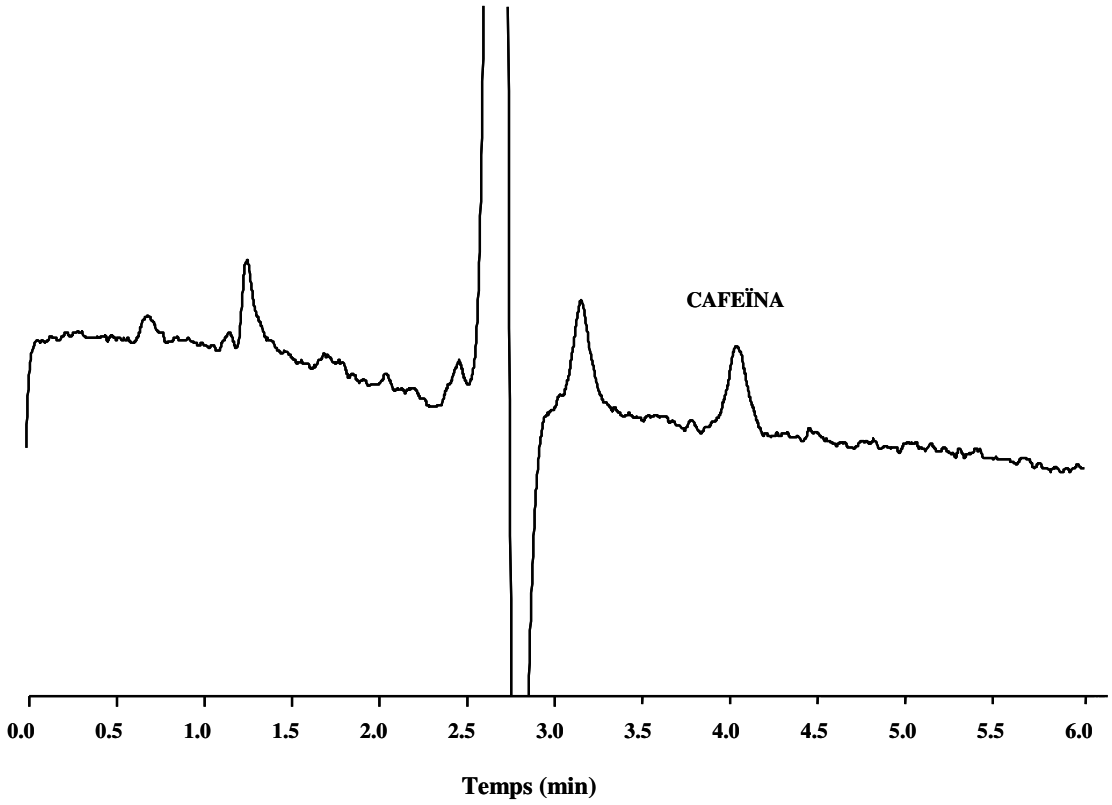


Figura 6.10. Cromatograma corresponent a un patró de 5 $\mu g \cdot L^{-1}$ de cafeïna.
Condicions cromatogràfiques: fase mòbil: acetonitril:aigua (20:80), λ = 272 nm i injecció 20 μL.

6.3.1.2. Interval lineal

S'ha comprovat que el mètode cromatogràfic és lineal a l'interval 4-1000 $\mu g \cdot L^{-1}$, interval dins el qual s'esperen obtenir les concentracions de les diferents mostres provinents de les EDAR. La linealitat de la corba s'ha determinat a partir de l'avaluació dels residuals. A la **Taula 6.6** es mostren els paràmetres de calibratge obtinguts aplicant el mètode de mínims quadrats per a sis patrons de cafeïna dintre de l'interval de concentració que s'ha indicat.

Taula 6.6. Paràmetres de calibratge de la cafeïna obtinguts mitjançant el mètode de mínims quadrats.

CAFEÏNA	
a (s_a)	-130 (30)
b (s_b)	69.9 (0.4)
R^2	0.9999
LQ	4 $\mu g \cdot L^{-1}$
LD	1 $\mu g \cdot L^{-1}$
Interval lineal	4-1000 $\mu g \cdot L^{-1}$

6.3.1.3. Altres paràmetres de qualitat

Hi ha dos paràmetres més que fan referència a la precisió del mètode, la *repetibilitat* i la *reproduïbilitat*. El resultat obtingut de repetibilitat ha estat d'una desviació estàndard relativa (RSD) del 2.0 %. Aquest paràmetre s'ha determinat a partir de 10 injeccions consecutives d'un patró de 10 $\mu g \cdot L^{-1}$. La reproduïbilitat s'ha determinat a partir de la injecció del mateix patró durant 10 dies consecutius, 1 injecció per dia, i ha donat una RSD del 5.6 %.

6.3.2. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE SPE "*OFF-LINE*" PER A LA CAFEÏNA

Anàlisis preliminars de mostres d'aigua provinents de les diferents depuradores van mostrar que l'anàlisi directa del contingut de cafeïna en les mateixes no és possible en la gran majoria de casos degut a la baixa concentració de l'anàlit a les mostres. Així, la introducció d'una etapa de concentració per a la cafeïna és necessària. Aquesta etapa servirà, a la vegada, com a etapa de "*clean-up*" per a l'eliminació de possibles impureses i interferents.

En aquest estudi es caracteritza un mètode d'extracció i preconcentració de cafeïna present en mostres aquoses per extracció en fase sòlida mitjançant l'adsorbent comercial ACCUBOND® C18. Per tal de caracteritzar el sistema s'han estudiat els paràmetres que afecten el procés SPE.

6.3.2.1. Volum de trencament

El volum de trencament és el volum necessari de mostra per a que l'anàlit comença a arribar a la sortida del cartutx sense que sigui degudament retingut per l'adsorbent ja que es comença a saturar. Generalment, es considera el volum de trencament com el volum pel qual s'observa a la sortida de la columna un 5% de la concentració d'anàlit que hi ha a l'entrada. A partir d'aquest punt, la concentració de l'anàlit a la sortida del cartutx va augmentant fins que la concentració a la sortida és igual que a l'entrada, és llavors que es diu que l'adsorbent està saturat. A la **Figura 6.11** es mostra la concentració de cafeïna final respecte a la inicial enfront del volum de càrrega de mostra. A partir de les dades experimentals de la **Figura 6.11** es calcula el volum de trencament, que en aquest experiment va ser de 26 mg de cafeïna (52 mL per a una concentració de cafeïna a la mostra de 500 $mg \cdot L^{-1}$). Els nivells que es troben habitualment a les aigües residuals no superen aquests 26 mg trobats a l'estudi de la corba de trencament. En general s'espera que els nivells de cafeïna es trobin en l'ordre dels micrograms per a volums de mostra de fins a 1 L. Això indica que el cartutx comercial pot ser emprat sense problemes de saturació en aquestes mostres.

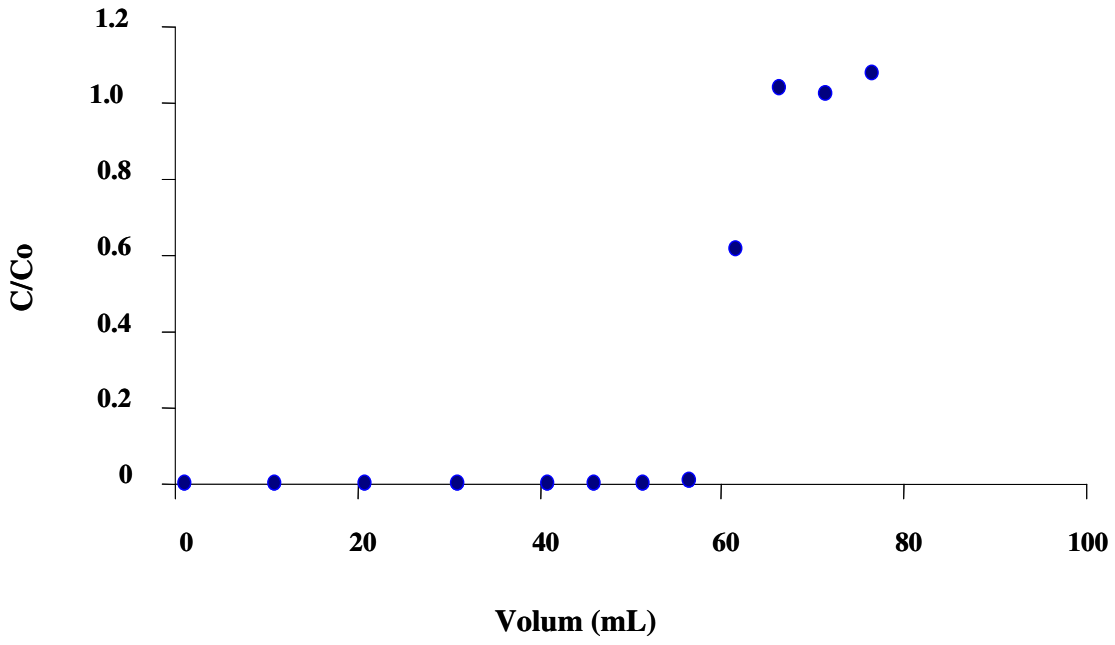


Figura 6.11. Representació de la concentració de cafeïna a la sortida respecte a la de l'entrada amb el volum de càrrega d'un patró de 500 mg·L^{-1}.
Condicions experimentals: condicionament amb 2 mL de metanol i 2 mL d'aigua, càrrega d'un patró de 500 mg·L^{-1} de cafeïna (100 mL), anàlisi directa a l'HPLC.

6.3.2.2. Dissolvent d'elució

S'ha avaluat l'eficiència de dos dissolvents (acetonitril i metanol) per a l'elució quantitativa de la cafeïna de l'adsorbent ACCUBOND® C18. Per fer aquest estudi es carreguen 100 mL de dissolució patró de 0.1 mg·L^{-1} de cafeïna i s'elueix l'anàlit amb solucions d'acetonitril, metanol i barreges amb diferents proporcions de metanol:aigua. En el cas d'utilitzar acetonitril com a dissolvent d'elució no s'obtingueren desorcions quantitatives en cap dels experiments, per la qual cosa aquest dissolvent es descarta. Els resultats per al metanol i les barreges mertanol:aigua es mostren a la **Taula 6.7**. S'observa que en augmentar el contingut de metanol en la barreja d'elució s'incrementa el percentatge de recuperació de cafeïna, o sigui, augmenta l'efectivitat del dissolvent d'elució per desorbir la cafeïna del cartutx SPE. Els resultats mostren que cal una proporció de metanol superior al 60% (en volum) per aconseguir recuperacions quantitatives de la cafeïna. L'estudi estadístic de les dades obtingudes utilitzant percentatges de metanol entre 60 i 100 % mostren que no hi ha diferències significatives

en les recuperacions obtingudes emprant aquestes proporcions de MeOH (P = 0.053) i per tant es decideix treballar amb un 100 % MeOH ja que l'ús d'aquest dissolvent pur no afecta a la resposta del mètode cromatogràfic, com ja s'ha indicat anteriorment.

Taula 6.7. Percentatge de recuperació de la cafeïna amb diferents solucions de MeOH:aigua (n=2). Condicions experimentals: condicionament del sorbent SPE amb 2 mL de metanol i 2 mL d'aigua, càrrega de 100 mL de patró de 0.1 $mg \cdot L^{-1}$ de cafeïna, flux de càrrega de 1 $mL \cdot min^{-1}$, desorció per gravetat amb 2 mL de la barreja indicada.

% MeOH	% REC (s)
100	96.5 (0.7)
80	98 (2)
70	101 (1)
60	92 (1)
40	19.0 (0.7)
20	0 (-)
0	0 (-)

6.3.2.3. Velocitat de càrrega

El flux de la mostra a través de la fase sòlida és un paràmetre important quan el volum de mostra és elevat. En aquests casos interessa treballar al flux més elevat possible, sense que s'observin disminucions en la retenció dels anàlits, per disminuir el temps de tractament de cada mostra. Weigel et al. [39] carreguen grans volums de mostres procedents del Mar del Nord a velocitats elevades, 500 $mL \cdot min^{-1}$. S'han assajat diferents fluxos de càrrega, entre 1 i 25 $mL \cdot min^{-1}$, i els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 6.8**. No hi ha diferències estadísticament significatives entre les recuperacions obtingudes a tots els fluxos avaluats (P= 0.21).

Taula 6.8. Recuperacions obtingudes per a 100 mL de cafeïna a una concentració de 0.1 mg·L^{-1} (n = 3). Condicions experimentals: condicionament amb 2 mL de metanol i 2 mL d'aigua, elució amb 2 mL de metanol.

Flux (mL·min^{-1})	% REC
1	106 ± 11
5	98 ± 1
7	98 ± 2
25	96 ± 3

6.3.2.4. Velocitat d'elució

Dins els paràmetres del procés SPE cal avaluar com afecta la velocitat d'elució sobre el volum d'eluent necessari per a la recuperació quantitativa de l'anàlit de la mostra. S'han provat velocitats d'elució de 1,2 i 5 mL·min^{-1} i també l'elució per gravetat. A totes les velocitats avaluades el volum d'elució necessari per a la recuperació quantitativa de la cafeïna és de 2 mL, sense que hi hagi variacions significatives en els resultats obtinguts.

6.3.3. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE SPE-HPLC "*ON-LINE*" PER A LA CAFEÏNA

Per augmentar l'eficàcia, sensibilitat i rapidesa en la determinació de compostos presents en mostres ambientals, s'han dissenyat diferents acoblaments "*on-line*" entre l'extracció en fase sòlida i la cromatografia líquida. La necessitat de crear a aquest tipus d'acoblaments neix en tenir com a mostres aigües naturals brutes o aigües residuals que cal sotmetre a una concentració i, sobretot, a un "*clean-up*" més efectiu. Patsias et al. [40] desenvolupen un sistema automatitzat SPE "*on-line*" amb HPLC per a l'anàlisi d'anilines, fenols i cafeïna en matrius aquoses. Chen et al. [41] avaluen quatre adsorbents per realitzar el procés SPE per a la cafeïna i, posteriorment, acoblar-la al sistema HPLC per poder determinar mostres aquoses ambientals. Obtenen unes recuperacions de 92±5% i un límit de detecció de 0.1 µg·L^{-1} en volums de mostra de 50

mL. Weigel et al. [39] acoblen el procés SPE a GC/MS per determinar compostos farmacèutics àcids, neutres i bàsics en mostres aquoses. Obtenen recuperacions elevades per a tots els compostos (70-100%) i detecten cafeïna, ibuprofen i els seus respectius metabòlits en aigües de riu en l'interval 1-100 $ng \cdot L^{-1}$.

En aquest estudi es caracteritza un procés SPE-HPLC "*on-line*" per a l'anàlisi de cafeïna en mostres ambientals. Per tal de caracteritzar el sistema s'han estudiat els paràmetres que afecten al procés "*on-line*".

6.3.3.1. Capacitat d'extracció de la mini-columna (procés "*at-line*")

Com s'ha indicat a la secció experimental, s'ha dissenyat una mini-columna farcida de l'adsorbent AccuBond® C18 que pot ser fàcilment acoblada "*on-line*" al sistema cromatogràfic (**Figura 6.9**). Per verificar l'efectivitat de la mini-columna es dissenya inicialment un procés "*at-line*", sense acoblar-lo encara a l'HPLC, per avaluar el procés d'extracció en fase sòlida i poder determinar les dimensions òptimes que ha de tenir la mini-columna. Finalment, s'ha avaluat la linealitat del mètode de preconcentració amb la mini-columna.

Primerament s'ha avaluat el pes d'adsorbent més adequat per al farciment de la mini-columna. S'han confeccionant mini-columnes amb 25, 50 i 100 mg d'adsorbent provinent d'un cartutx comercial. La quantitat d'adsorbent s'agafa per pesada i s'empaqueta dins la mini-columna mitjançant un sistema per aspiració al buit. Es selecciona una concentració de cafeïna de 100 $ng \cdot L^{-1}$ per fer aquest estudi de saturació de la mini-columna ja que diferents assaigs previs indiquen que les concentracions més elevades que s'esperen trobar a les mostres es troben al voltant d'aquest valor. Tal i com s'observa a la **Taula 6.9** amb 25 mg d'adsorbent es satura la mini-columna i no es recupera quantitativament la cafeïna. Els resultats obtinguts amb 50 i 100 mg són estadísticament equivalents ($P=0.06$) i no mostren saturació de la mini-columna. Es decideix treballar amb 100 mg per prevenir possibles saturacions en cas de trobar alguna mostra amb contingut superior de cafeïna al que s'ha avaluat.

Taula 6.9. Valors de recuperació obtinguts en el procés "*at-line*" per a la cafeïna en l'estudi del pes d'adsorbent que conté la mini-columna (n = 3). Condicions experimentals: càrrega de 5 mL de patró a 100 ng·L^{-1}, volum d'elució: 300 µL de metanol, injecció "*off-line*" a l'HPLC.

Pes adsorbent (mg)	% Recuperació
25	39 ± 11
50	94 ± 5
100	101 ± 2

Una vegada seleccionada una massa de 100 mg d'adsorbent per al farciment de la mini-columna s'avalua el volum de metanol necessari per a la desorció quantitativa de la cafeïna retinguda (**Taula 6.10**). S'han estudiat tres volums de metanol: 100, 150 i 300 µL. L'avaluació estadística dels resultats mostra que hi ha diferències significatives entre els tres valors ($P<0.01$), sent necessaris volums superiors al 100 µL per a desorbir quantitativament la cafeïna retinguda pel sorbent. A pesar de la seva similitud, els resultats obtinguts per a 150 i 300 µL d'eluent tampoc són estadísticament equivalents ($P=0.006$). Per tant, és necessari treballar amb volums d'elució de 300 µL o superiors per assegurar una desorció quantitativa de la cafeïna.

Taula 6.10. Valors de recuperació obtinguts en el procés "*at-line*" per a la cafeïna en l'estudi del volum d'elució (n = 3). Condicions experimentals: mini-columna de 100 mg d'adsorbent ACCUBOND® C18, carrega de 5 mL de patró de 100 ng·L^{-1}, injecció "*off-line*" a l'HPLC.

Volum elució (µL)	% Recuperació
100	40 ± 7
150	99 ± 1
300	104 ± 2

Finalment, s'avalua la recuperació obtinguda a diferentes nivells de concentració de cafeïna amb la mini-columna. A la **Taula 6.11** s'observen els percentatges de recuperació per a patrons a tres nivells de concentració, des de 25 ng·L^{-1} fins a

100 ng·L^{-1}, processats a través de la mini-columna. L'anàlisi estadística mostra que les recuperacions obtingudes a les tres concentracions són equivalents (P = 0.13). L'anàlisi de la recuperació a nivells de concentració inferiors (10 ng·L^{-1}) sí que mostra diferències significatives amb les altres concentracions (P<0.01). Així doncs, el límit inferior de linealitat en la recuperació de cafeïna amb la mini-columna s'estableix per sobre de 10 ng·L^{-1}.

Taula 6.11. Valors de recuperació en el procés "*at-line*" per a la cafeïna a diferents concentracions (n = 3). Condicions experimentals: mini-columna de 100 mg d'adsorbent ACCUBOND® C18, elució amb 300 µL de metanol, injecció "*off-line*" a l'HPLC.

Concentració cafeïna (ng·L^{-1})	**% Recuperació**
100	105 ± 3
50	101 ± 2
25	101 ± 2

6.3.3.2. El procés SPE-HPLC "*on-line*": calibratge de la cafeïna

Un cop comprovat mitjançant el sistema "*at-line*" que la recuperació i determinació de la cafeïna és quantitativa i el bon funcionament de la mini-columna, es va passar a realitzar l'acoblament a l'HPLC i procedir al procés SPE-HPLC "*on-line*". A la **Taula 6.12** es mostren els paràmetres de calibratge de la cafeïna obtinguts mitjançant el procés "*on-line*".

Com ja s'ha indicat a l'apartat anterior, el límit inferior de linealitat mitjançant el mètode "*at-line*" es va trobar que es situava entre 10 i 25 ng·L^{-1}. Mitjançant el calibratge "*on-line*" s'ha determinat experimentalment que el límit inferior de linealitat (i.e. límit de quantificació) és de 15 ng·L^{-1}. La linealitat s'ha avaluat fins a 200 ng·L^{-1}, sense que s'observin desviacions de la linealitat en aquest interval.

Taula 6.12. Paràmetres de calibratge de la cafeïna obtinguts mitjançant el mètode de mínims quadrats per al sistema SPE-HPLC "*on-line*". LD: límit de detecció; LQ: límit de quantificació.

CAFEÏNA	
a (s_a) ($\cdot 10^4$)	1 (2)
b (s_b) ($\cdot 10^2$)	42 (2)
R^2	0.9939
LQ	15 ng·L^{-1}
LD	5 ng·L^{-1}
Interval lineal	15-200 µg·L^{-1}

A la **Figura 6.12** es mostra la superposició de dos cromatogrames per a un patró de cafeïna de 50 ng·L^{-1} (recordem que el límit de quantificació del mètode cromatogràfic és de 4 µg·L^{-1}), un cromatograma ha estat obtingut després de la concentració de la cafeïna pel mètode "*off-line*" (línia discontínua) i l'altre pel mètode "*on-line*" (línia contínua). Es pot observar com el pic corresponent a la cafeïna (temps de retenció de 4.2 minuts) no és diferència del soroll de fons en el mètode "*off-line*", quedant aquest patró queda per sota del LD aplicant aquesta metodologia. No obstant, si ens fixem en el cromatograma obtingut mitjançant el procés SPE-HPLC "*on-line*", per a la mateixa concentració d'anàlit el pic de la cafeïna es veu perfectament i és possible la seva quantificació. Això mostra l'elevat guany en sensibilitat obtingut mitjançant l'acoblament SPE-HPLC "*on-line*". El límit de detecció del procés SPE "*off-line*" és de 1000 ng·L^{-1}, mentre que per al procés "*on-line*" es redueix fins a 15 ng·L^{-1}, el que és 67 vegades més baix.

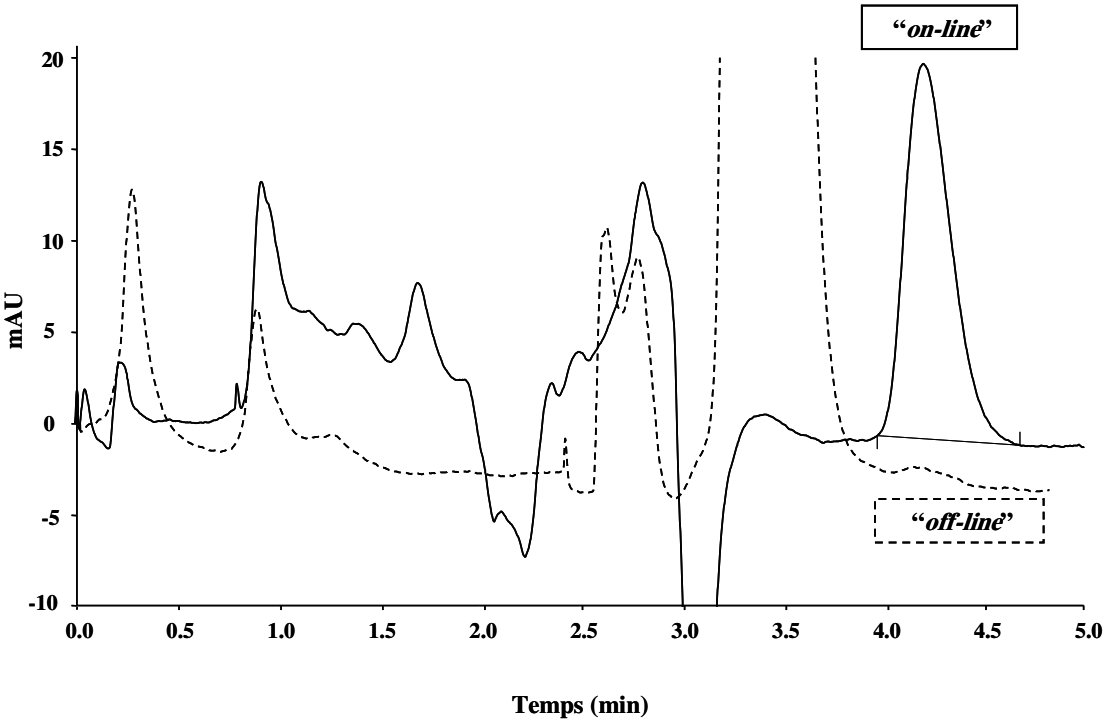


Figura 6.12. Superposició de dos cromatogrames d'un patró de 50 ng·L^{-1} de cafeïna. La línia discontínua correspon a la injecció del patró tractat amb el procediment SPE "*off-line*", la línia contínua correspon a l'anàlisi del mateix patró amb el mètode SPE-HPLC "*on-line*".

El sistema d'extracció "*on-line*" presenta avantatges tals com: (i) permet eluir la cafeïna amb un volum més petit, maximitzant el factor de concentració; (ii) permet conduir directament el volum eluït cap al "*loop*" d'injecció de l'HPLC, disminuint errors i reduint el temps d'anàlisi total per a cada mostra.

Per tal d'avaluar el procés SPE-HPLC "*on-line*" es van analitzar diverses mostres d'aigües naturals procedents de rius i rieres properes a nuclis urbans. En la **Figura 6.13** s'observa un exemple (a) d'un cromatograma d'una mostra d'aigua natural amb un contingut de cafeïna de 0.9 ng·L^{-1} i (b) d'un cromatograma de la mateixa mostra fortificada a nivell de 10 ng·L^{-1} (recuperació del 101%). Les aigües naturals no tenen un alt contingut de matèria orgànica i això permet utilitzar la mini-columna vàries vegades utilitzant un rentat d'aigua de la columna entre mostra i mostra. S'ha comprovat que la mini-columna no perd la seva eficàcia (recuperacions > 98%) quan

s'utilitza en l'anàlisi de fins a 3 mostres seguides d'una aigua natural fortificada amb 10 ng·L^{-1} de cafeïna.

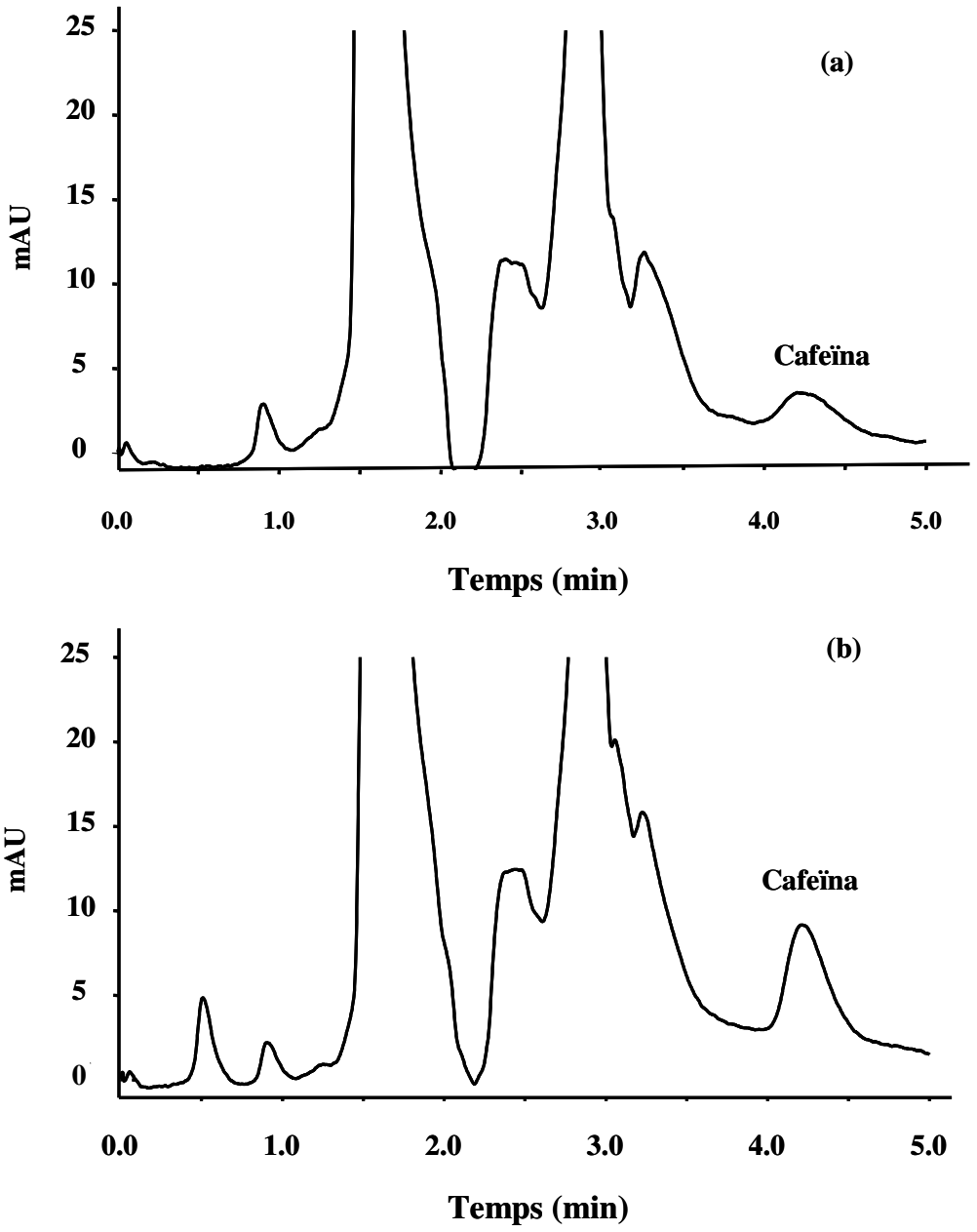


Figura 6.13. Cromatogrames corresponents a una mostra d'aigua natural (a) mostra sense fortificar (b) mostra fortificada a nivell 10 ng·L^{-1}. Les mostres han estat analitzades mitjançant el procés SPE-HPLC "*on-line*".

6.3.4. SEGUIMENT DE CAFEÏNA EN AIGÜES NATURALS

Com ja s'ha comentat a la introducció, l'estudi que es presenta a continuació forma part d'un projecte més ampli que té com a objectiu avaluar el possible impacte de les EDARs en la qualitat de l'aigua de tres rieres de la Costa Brava, la riera de Tossa, el riu Ridaura i la riera Aubí. En aquest projecte, promogut per el Consorci de la Costa Brava i en el qual participen grups de disciplines i institucions diferents, es contemplen els diferents aspectes de la qualitat de l'aigua, amb el seguiment de paràmetres químics, microbiològics i ecològics. Referent a la qualitat química s'ha fet un seguiment dels cations i anions majoritaris, pH, conductivitat i TOC i s'ha determinat un ampli ventall de compostos orgànics que inclou VOCs, ftalats, plaguicides, subproductes de desinfecció de l'aigua i cafeïna. La discussió de tots el resultats obtinguts cau fora dels objectius de la present tesi. Aquest treball es centra en la cafeïna com a marcador químic de contaminació de les aigües naturals per aigües residuals urbanes.

La cafeïna és una de les substàncies més àmpliament consumides en el món i es pot trobar en aliments, begudes i preparats farmacèutics. Alguns autors estimen un consum mitjà global de 70 mg/persona. dia [41], encara que pot variar molt segons els països. Un percentatge de la cafeïna passa sense canvis a través del cos humà i s'elimina per l'orina. A més, s'aboquen directament per les piques domèstiques quantitats relativament importants de cafè i te. Com a conseqüència, a les EDARs arriben quantitats significatives de cafeïna. Els efluents de les depuradores d'aigües residuals urbanes poden ser una font de cafeïna a les aigües naturals si aquesta substància no es eliminada completament en el procés de tractament. Una altra font podria ser l'abocament d'aigua residual no tractada directament als rius i rieres, com per exemple en episodis de fortes pluges que facin la capacitat de tractament de la planta s'arribi a superar.

A la **Taula 6.13** es mostren els resultats obtinguts en el seguiment de la cafeïna en les rieres objecte d'estudi, la riera de Tossa, el riu Ridaura i la riera Aubí, així com les concentracions d'aquesta substàncies trobades en els efluents de les EDARs que aboquen a aquest cursos d'aigua (EDAR Tossa, EDAR Castell-Platja d'Aro i EDAR Palamós respectivament).

Taula 6.13. Resultats obtinguts en el seguiment de cafeïna ($\mu g \cdot L^{-1}$) en les tres rieres avaluades i els efluents de les corresponents EDARs. Descripció detallada dels punts de presa de mostra en la secció experimental . (n.d: no detectat i (–) la riera o punt estava seca).

	Data de mostreig										
Rieres	**2003**				**2004**						**2005**
Tossa	**28-03**	**01-07**	**18-09**	**18-12**	**25-03**	**20-04**	**20-05**	**29-07**	**06-10**	**14-12**	**27-09**
P1	n.d	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
P2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5.0	3.0	n.d	-
Secundari	0.2	300	110	133	3.4	5.3	7.0	80	4.3	26.1	6.1
Terciari	0.1	320	90	170	2.4	2.6	2.0	57	1.2	3.4	8.3
Pou	n.d	n.d	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-
Bassa	n.d	n.d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2004					**2005**					
Ridaura	**20-04**	**20-05**	**29-07**	**06-10**	**14-12**	**07-03**	**23-05**	**30-05**	**01-07**	**27-09**	**15-12**
Secundari	14.1	23.5	46.8	8.9	7.2	9.2	25.2	30.6	18.1	n.d	10.5
Terciari	8.9	4.7	18.9	3.7	4.3	8.3	25.8	33.7	15.2	n.d	2.3
P3	n.d	2.0	6.3	-	-	n.d	n.d	-	n.d	-	n.d
P5	n.d	n.d	n.d	3.9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
P5’	-	-	-	-	-	-	-	n.d	n.d	-	-
	2005				**2006**						
Aubí	**07-03**	**23-05**	**19-09**	**30-11**	**16-03**						
Secundari	12.0	27.0	34.3	24.2	11.1						
Terciari	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d						
P3	n.d	n.d	-	n.d	n.d						
P4	n.d	n.d	n.d	3.9	n.d						
P6	n.d	n.d	2.6	n.d	n.d						

Respecte els punts de presa de mostra escollits, i en base als resultats analítics, els punts de les rieres aigües amunt de les EDARs són punts de referència de la qualitat de l’aigua en el moment en que aquesta qualitat no es veu afectada per l’abocament de l’efluent de la planta de tractament. En aquests punts tan sols és possible la circulació de cabals naturals o bé la seva absència causada per l’estiatge. En canvi, en els punts situats pocs metres aigües avall dels punts d’abocament de les EDARs, corresponen als indrets on es manifesten amb més intensitat els efectes de l’abocament de l’aigua tractada, i presenta una variabilitat més gran en la seva qualitat. En aquests punts, així com en d’altres situats aigües avall d’aquests, s’hi poden trobar des de cabals que corresponen íntegrament a l’efluent secundari de l’EDAR fins a cabals que són un mescla, en proporcions variables al llarg de l’any, dels cabals naturals i de l’efluent secundari abocat.

Com s’observa a la **Taula 6.13**, les concentracions de cafeïna trobades en les aigües naturals oscil·len entre el límit de detecció i uns pocs $\mu g \cdot L^{-1}$ i aquesta substància

es detecta en poques ocasions. Aquests resultats són comparables als d'altres estudis com el de Verenitch et. [5] que analitza mostres d'aigua de rius procedents de llocs propers a plantes de tractament d'aigües residuals urbanes. Batt et al. [26] reporten concentracions de cafeïna entre 0.19 i 9.9 $\mu g \cdot L^{-1}$, de l'ordre de les determinades en aquest treball.

A la riera de Tossa no es va detectar cafeïna en cap de les mostres analitzades l'any 2003 i referent al seguiment corresponent a 2004 es va detectar cafeïna en el punt situat pocs metres aigües avall de l'EDAR de Tossa (punt P2) els mesos de juliol i octubre amb concentracions de 5 $\mu g \cdot L^{-1}$ i 3 $\mu g \cdot L^{-1}$ respectivament. Sembla poc probable, però, que la cafeïna provingui de l'efluent de la depuradora, ja que encara que aquesta es detecta en l'efluent terciari de l'EDAR, l'aigua tractada es infiltrada abans d'arribar a la riera i no s'ha determinat cafeïna en cap de les mostres d'aigua del pou d'infiltració.

En el cas del riu Ridaura, només en la mostra d'octubre de 2004 es va detectar cafeïna a una concentració de 3.9 $\mu g \cdot L^{-1}$ aigües avall de l'EDAR Castell-Platja d'Aro (punt P5). També l'any 2004 es va detectar cafeïna en les mostres de maig i juliol del punt aigües amunt de l'EDAR (P3) i a concentracions del mateix ordre (2.0 $\mu g \cdot L^{-1}$ i 6.3 $\mu g \cdot L^{-1}$ respectivament). L'origen de cafeïna en aquest cas podria ser aigua residual no tractada, però que òbviament no prové de l'EDAR. En cap de les mostres d'aigua del riu analitzades l'any 2005 es va detectar cafeïna.

Resultats similars s'han obtingut per les mostres de la riera Aubí. No s'ha detectat cafeïna en el punt P3 situat aigües amunt de l'EDAR de Palamós i les concentracions trobades en els mesos de setembre i novembre en les mostres dels punts aigües avall han estat de 3.9 $\mu g \cdot L^{-1}$ i 2.6 $\mu g \cdot L^{-1}$ respectivament.

A partir dels resultats obtinguts podem dir que no s'observa una aportació de cafeïna a les aigües superficials per part de les EDARs considerades i en les dates en les quals s'han agafat mostres de les rieres. A partir de les mostres analitzades no es poden treure conclusions més generals. S'ha de tenir en compte que es tracta d'un seguiment amb periodicitat trimestral dissenyat per a obtenir informació no només de la qualitat química sinó també de la qualitat ecològica i microbiològica de l'aigua de les rieres. Per tal d'avaluar el paper de la cafeïna com a marcador de contaminació per aigües residuals de forma més determinant caldria un seguiment més continuat en el temps que tingui en consideració condicions diferents de funcionament de les EDARs, per exemple episodis de pluja que puguin provocar eventualment l'abocament d'aigües residuals sense tractar a les aigües naturals.

Finalment, comentar breument els resultats corresponents a les mostres dels efluents de les EDARs, que també es apareixen recollits en la **Taula 6.13**. Com podem observar es detecta cafeïna en totes les mostres dels efluents secundaris de les plantes de tractament en concentracions que oscil·len entre els valors de pocs $\mu g \cdot L^{-1}$ determinats per les mostres de les plantes de Tossa i Castell-Platja d'Aro a la tardor i l'hivern als centenars de $\mu g \cdot L^{-1}$ de les mostres de l'EDAR de Tossa a l'estiu.

A partir d'aquest resultats es va plantejar fer un seguiment més detallat de la cafeïna en les diferents etapes del procés de tractament de les aigües residuals. Els resultats obtinguts en aquest estudi es presenten en la secció següent.

6.3.5. SEGUIMENT DE LA CAFEÏNA EN EL PROCÉS DE DEPURACIÓ D'AIGÜES RESIDUALS URBANES

L'objectiu d'aquest estudi és obtenir informació sobre l'eliminació de la cafeïna en les diferents etapes del tractament d'aigües. Amb aquesta finalitat s'han seleccionat les EDARs de tres poblacions de la Costa Brava: Empuriabrava, Pals i Palamós. A la introducció d'aquest capítol s'han indicat les característiques tècniques més rellevants de les tres plantes de tractament i a la part experimental una descripció dels punts de presa de mostra. Destacar que, a diferència de les altres dues plantes estudiades, l'EDAR Empuriabrava disposa, a més d'uns sistema de llacunatge, d'uns d'aiguamolls construïts (SAC) formats per tres basses que alimenten el Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà.

L'estudi es va portar a terme durant el mes juliol de 2005, període en que les EDARs funcionen a la seva màxima capacitat donat l'important increment de població de la zona a l'estiu, i amb una campanya de presa de mostra a l'octubre, quan l'afluència turística ja no és significativa. Per a l'anàlisi de les mostres es va utilitzar el mètode *"off-line"*, descrit amb anterioritat en aquest capítol, per a les nostres d'aigua residual amb elevat contingut de matèria orgànica, ja que permet un *cleanup* més efectiu.

Els resultats obtinguts es recullen a la **Taula 6.14**. Es pot observar que les concentracions de cafeïna en les aigües residuals d'entrada a les depuradores es troben en l'interval 50 $\mu g \cdot L^{-1}$-120 $\mu g \cdot L^{-1}$, amb mitjanes de 92.9 $\mu g \cdot L^{-1}$ per a l'EDAR Empuriabrava, 59.2 $\mu g \cdot L^{-1}$ per a l'EDAR Pals i 76.6 $\mu g \cdot L^{-1}$ per a l'EDAR Palamós. Si

aquestes concentracions es normalitzen tenint en compte la població i el cabal tractat (hem considerat el de disseny de la depuradora), s'obtenen valors semblants de la quantitat de cafeïna per persona i dia en les tres EDARs, 23.2 mg, 14.8 mg i 15.2 mg per Empuriabrava, Pals i Palamós respectivament. Aquests resultats són d'ordres similars als trobats en altres estudis com el de Buerge et al. [1], que reporten concentracions de cafeïna en les aigües residuals d'entrada a depuradores suïsses de 77 $\mu g \cdot L^{-1}$, o les trobades en el treball de Standley et al. [2].

Taula 6.14. Resultats obtinguts de concentració de cafeïna ($\mu g \cdot L^{-1}$) a les tres EDAR avaluades. Mostres corresponents als dies 06-07-05 (1), 11-07-05 (2), 14-07-05 (3), 18-07-05 (4), 21-07-05 (5), 27-07-05 (6) i 04-10-05 (7). n.d: no detectat.

EDAR	**Data mostreig**						
Empuria Brava	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Entrada	104.7	110.7	77.0	82.3	119.7	70.5	85.2
Biològic	0.6	1.2	n.d	n.d	0.5	0.8	n.d
Decantador	0.6	0.4	n.d	n.d	n.d	0.6	n.d
Llacuna	0.1	0.2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
SAC Entrada	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Sortida SAC1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Sortida SAC2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Sortida SAC3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Pals							
Entrada	55.3	60.3	59.0	77.6	57.9	49.4	54.7
Biològic	n.d	n.d	n.d	0.2	n.d	n.d	n.d
Decantador	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Palamós							
Entrada	80.7	89.1	75.5	92.4	49.4	82.6	66.6
Sortida Primari	58.8	67.8	44.1	64.4	44.4	55.3	53.1
Recirculació	0.2	n.d	1.2	n.d	0.5	n.d	n.d
Decantador	0.7	1.1	1.2	n.d	n.d	n.d	n.d
Terciari	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

En el cas de l'EDAR Palamós s'han analitzat mostres de la sortida del tractament primari que té per objectiu d'eliminar part dels sòlids que conté l'aigua residual d'entrada. Podem observar que en aquesta etapa no es produeix una eliminació important de la cafeïna. Aquest fet es pot explicar si tenim en compte que la cafeïna mostra una baixa adsorció en sòlids, d'acord amb l'elevada solubilitat en aigua de la cafeïna (29 $g \cdot L^{-1}$) i el baix valor del coeficient de partició octanol-aigua ($\log P_{ow} \approx 0$) [1].

Els resultats indiquen també una eliminació superior al 99 % en el tractament biològic per fangs activats, que es pot atribuir a la degradació microbiològica i en una petita mesura a l'adsorció en el fang. Així, la màxima concentració de cafeïna trobada a la sortida dels decantadors del tractaments biològics ha estat de 0.7 $\mu g \cdot L^{-1}$. No s'observen diferències en l'eficiència de l'eliminació de cafeïna per a les tres plantes de tractament avaluades.

Podem observar que no es detecta cafeïna a la sortida del tractament terciari, en les EDARs que disposen d'aquesta etapa. Hem de destacar també que les llacunes de tractament (EDAR Empuriabrava) es mostren eficients en l'eliminació de la cafeïna.

6.5. REFERÈNCIES

1. I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H-R. Buser, Environ. Sci. Technol., 37 (2003), 691.
2. L.J. Standley, L.A. Kaplan, D. Smith, Environ. Sci. Technol., 34 (2000), 3124.
3. M. Statheropoulus, E. Smaragdis, N. Tzamtzis, C. Georgakopoulos, Anal. Chim. Acta, 331 (1996), 53.
4. A-K. Su, J-T. Liu, C-H. Lin, Talanta, 67 (2005), 718.
5. S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, J. Chromatogr. A, 1116 (2006), 193.
6. S. Song, D.L. Ashley, J. Chromatogr. A, 814 (1998), 171.
7. B.B. Borse, L. Jagan, S. Nagalakshmi, N. Krishnamurthy, Food Chemistry, 79 (4) (2002), 419.
8. D. Bendz, N.A. Paxéus, T.R. Ginn, F.J. Loge, J. Hazardous Materials, 122 (2005), 195.
9. N. Prévide Bernardo, M.E. Pereira Bastos Siqueira, M.J. Nunes de Paiva, P. Penido Maia, Int. J. Of Drug Policy, 14 (2003), 331.
10. T. Shasar, S. Dagan, A. Amirav, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 9 (1998), 628.
11. R.A. Jacques, L.S. Freitas, V.F. Pérez, C. Dariva, A.P. Oliveira, J.V. Oliveira, E.B. Caramao, Ultrasonics Sonochemistry, en premsa.
12. S. Weigel, K. Bester, H. Hühnerfuss, J. Chromatogr. A, 912 (2001), 151
13. J.A. Staeb, O.J. Epema, P. van Duijn, J. Steevens, V.A. Klap, I.L. Freriks, J. Chormatogr. A, 974 (2002), 223.
14. Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng, Talanta, 57 (2002), 307.
15. H. Horie, A. Nesumi, T. Ujihara, K. Kohata, J. Chromatogr. A, 942 (2002), 271.
16. E. Nishitani, Y. M. Sagesaka, J. Food Comp. Anal., 17 (2004), 675.
17. X. Zhu, B. Chen, M. Ma, X. Luo, F. Zhang, S. Yao, Z. Wan, D. Yang, H. Hang, J. Of Pharmaceutical and Biomedical Anal., 34 (2004), 695.
18. C. Barbas, A. García, L. Saavedra, M. Castro, J. Chromatogr. A 870 (2000), 97.
19. A.M. Di Pietra, R. Gatti, V. Andrisano, V. Cavrini, J. Chromatogr. A, 729 (1996), 355.
20. J.P. Naik, J. Agric. Food Chem. 49 (2001), 3579.
21. G. Maiani, M. Serafini, M. Salucci, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, J. Chromatogr. A, 692 (1997), 311.
22. H. Kanazawa, R. Atsumi, Y. Matsushima, J. Kizu, J. Chromatogr. A, 870 (2000), 87.
23. E. Bendriss, N. Markoglou, I.W. Wainer, J. Chromatogr. B, 746 (2000), 331.
24. T. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, J. Chromatogr. A, 938 (2001), 175.
25. P.R. Gardinali, X. Zhao, Environ. Int., 28 (2002), 521.
26. A.L. Batt, I.B. Bruce, D.S. Aga, Environ. Pollution, 142 (2006), 295.
27. B-L. Lee, C-N. Ong, J. Chromatogr. A, 881 (2000), 439.
28. D.J. Weiss, C.R. Anderton, J. Chromatogr. A, 1011 (2003), 173.
29. H. Horie, T. Mukai, K. Kohata, J. Chromatogr. A, 758 (1997), 332.
30. H. Horie, K. Kohata, J. Chromatogr. A, 802 (1998), 219.
31. L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, J Chromatogr. A, 827 (1998), 113.

32. J.P. Aucamp, Y. Hara, Z. Apostolides, J. Chromatogr. A, 876 (2000), 235.
33. J.C. Walker, S.E. Zaugg, E.B. Walker, J. Chromatogr. A, 781 (1997), 481.
34. R. Dorfner, T. Ferge, C. Yeretzian, A. Kettrup, R. Zimmermann, Anal. Chem., 76 (2004), 1386.
35. M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, L.F. Capitán-Vallvey, Talanta 49 (1999), 691.
36. N.M. Aragao, M.C.C. Veloso, M.S. Bispo, S.L.C. Ferreira, J.B. de Andrade, Talanta, 67 (2005), 1007.
37. A.W. Abu-Qare, M.B. Abou-Donia, J. Pharm. Biom. Anal., 26 (2001), 939.
38. A. Serrat Massó, Projecte Final de Carrera, "Correlació entre l'anàlisi sensorial i el contingut en cafeïna i esterols del cafè Expresso", (2002), Universitat de Girona.
39. S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, J. Chromatogr. A, 1023 (2004), 183.
40. J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou, J. Chromatogr. A, 904 (2000), 171.
41. Z. Chen, P. Pavelic, P. Dillon, R. Naidu, Water Research, 36 (2002), 4830.

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 per cromatografia líquida amb parell iònic per 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics (2-MP, 2-CP, 4-CP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) en mostres d'aigua i sòls. La separació dels set anàlits s'aconsegueix amb un temps inferior a 22 minuts amb una fase mòbil d'acetonitril:aigua (30:70), 10 mM de TBA-OH a un valor de pH de 7.2 i amb una longitud d'ona de treball de 230 nm. El mètode cromatogràfic desenvolupat presenta una bona linealitat i proporciona límits de detecció i quantificació per a tots els compostos de l'ordre dels $\mu g \cdot L^{-1}$.

Segona. Per a la concentració de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics en extractes de sòls s'ha avaluat l'eficàcia de fases sòlides de diferents característiques (una matriu de sílica amb cadenes C_{18} (ACCUBOND®), una resina de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB) XAD-2 i una fase de poliestirè-divinilbenzè (Bakerbond SDB-1). L'adsorbent òptim en les condicions alcalines de la mostra és la fase de poliestirè-divinilbenzè (Bakerbond SDB-1) per extractes de sòls. L'elució dels anàlits s'assoleix en dues fraccions, la primera amb 5 mL de metanol:aigua (1:1) on es recuperen quantitativament 2,4-D i MCPA. El 2-CP i 4-CP els quals són solubles en aigua, també són eluïts en aquestes condicions però les recuperacions són inferiors al 100 %. El 2-CP s'elueix en un percentatge superior al 90 % i el 4-CP només és eluït parcialment (entre 3-40 % depenent de la quantitat d'anàlit retingut). Els altres metabòlits (2-MP, 4-C-2-MP i 2,4-DCP) no són eluïts de l'adsorbent amb aquesta barreja i requereixen una segona elució amb 4 mL de metanol 100 %. En aquestes condicions s'aconsegueix l'eliminació de la interferència de la matèria orgànica present en els extractes dels sòls.

Tercera. S'ha avaluat un sistema de membrana líquida suportada (SLM) per a la determinació conjunta de 2,4-D, MCPA i els seus metabòlits fenòlics. S'han utilitzat dues geometries per tal d'aconseguir aquesta finalitat: en membranes laminars s'escull l'éter dihexílic com a millor dissolvent orgànic ja que dóna millors recuperacions per a una concentració de 1 $mg \cdot L^{-1}$ per a cada anàlit, a partir d'una fase de càrrega de 200 mL amb àcid sulfúric 0.1 M i emprant com a fase receptora una dissolució de 200 mL d'hidròxid sòdic 0.01 M. Treballant amb el sistema de membrana líquida amb

geometria de fibra buida (HFSLM) ha estat possible la concentració dels anàlits recirculant 50 mL de fase de càrrega per la part exterior de la fibra i 5 mL de fase receptora per el "*lumen*" durant una hora. Els factors de concentració obtinguts en aquestes condicions són 2.2, 2.9, 4.4, 6.0 i 5.6 per a MCPA, 2,4-D, 4-CP, 2,4-DCP i 4-C-2-MP, respectivament.

Quarta. El sistema de membrana líquida amb geometria de fibra buida s'ha aplicat a l'anàlisi d'extractes de sòl en un sistema "*on-line*" HFSLM-HPLC. L'estudi de diferents volums de fase de càrrega i fase receptora han mostrat que un volum de 20 mL de fase de càrrega (extracte de sòl fortificat a pH = 1) i 1 mL de fase receptora (dissolució d'hidròxid sòdic 0.01M) són adients. En aquest sistema s'han aconseguit bones repetibilitats (RSD inferiors al 5 %) i reproductibilitats (RDS inferiors al 8 %). El mètode és lineal en un interval de 1-25 $\mu g \cdot L^{-1}$ (anàlisi d'extractes fortificats). Els límits de detecció i quantificació trobats experimentalment per a tots els compostos en l'anàlisi de mostres de sòl fortificades són de 0.1 i 0.3 $\mu g \cdot L^{-1}$, respectivament.

Cinquena. S'han comparat les dues tècniques de concentració i "*clean-up*" (SPE i SLM) per a la determinació de 2,4-D, MCPA i metabòlits fenòlics en mostres de sòl. S'ha escollit les membranes líquides suportades en front de l'extracció en fase sòlida ja que proporcionen millors resultats ja que la fase receptora és un medi aquós més compatible amb el mètode IP-HPLC i tots els anàlits poden ser extrets i analitzats en una única fracció. La geometria de fibra buida proporciona límits de detecció (0.1 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}) inferiors a l'extracció en fase sòlida (3-10 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}) i permet fer un "*clean-up*" de la mostra de forma molt efectiva.

Sisena. La metodologia analítica desenvolupada s'ha aplicat a la determinació de les isotermes d'adsorció de 2,4-D, MCPA en sòls d'un camp de golf. A partir d'aquests experiments en "*batch*" s'obtenen unes constants de Freundlich de 0.62, 0.44 i 0.4 per al 2,4-D en sòls de tres profunditats i de 0.77, 0.65 i 0.44 per al MCPA en les mateixes condicions. Els assaigs en columnes ens proporcionen informació addicional en paràmetres d'adsorció i també de desorció.

Setena. S'ha estudiat el transport de 2,4-D i MCPA en un experiment de camp realitzat en el camp de golf "Serres de Pals". S'ha realitzat una aplicació controlada de

l'herbicida Bi-Hedonal® en una parcel·la de 100 m2 i s'ha fet un seguiment dels herbicides i els seus metabòlits amb el temps analitzant mostres de sòls de diferents profunditats. S'observa que en el sòl més superficial (0-10 cm) els nivells més elevats s'obtenen el primer dia després de l'aplicació (34.1 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per al 2,4-D i 17.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1} per al MCPA). La dilució dels anàlits a mesura que es van difonent a través del sòl, conjuntament amb la seva degradació, explica perquè no és possible detectar-los a major profunditat. Pel que respecte a la degradació del 2,4-D i MCPA als seus metabòlits fenòlics, trobem que el 2-MP es troba a concentració màxima (13.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}) al sòl de profunditat intermèdia 14 dies després de l'aplicació de l'herbicida passant per concentracions inferiors, fins a 0.4 $\mu g \cdot kg$ sòl^{-1}, a profunditat de 30-60 cm el dia 70 després d'aplicació. Els altres metabòlits fenòlics tenen comportament similar.

Vuitena. S'ha desenvolupat un mètode per a la determinació per cromatografia líquida en fase invertida per cafeïna amb una fase mòbil d'acetonitril:aigua (20:80) i fixant una longitud d'ona de treball de 272 nm. El mètode és lineal en un interval de 4-000 $\mu g \cdot L^{-1}$, i proporciona límits de detecció i quantificació de 1 i 4 $\mu g \cdot L^{-1}$, respectivament. El mètode presenta bones repetibilitats i reproductibilitats.

Novena. S'ha realitzat la concentració i "*clean-up*" de mostres d'aigua mitjançant un adsorbent de sílica amb cadenes C_{18} (ACCUBOND®), obtenint-se recuperacions quantitatives en treballar amb volums de 100 mL de mostra, a nivells de 0.1 $mg \cdot L^{-1}$, fluxos de càrrega de 25 $mL \cdot min^{-1}$ i elucions amb 2 mL de metanol. El límit de detecció de la cafeïna en aquest procés "*off-line*" amb l'HPLC és de 1000 $ng \cdot L^{-1}$. Per millorar aquests resultats s'ha desenvolupat un sistema "*on-line*" SPE-HPLC amb el qual s'obtenen recuperacions de 100±2 % (minicolumna de 100 mg, volum d'elució de 300 µL i concentracions entre 25 i 100 $ng \cdot L^{-1}$) i un límit de detecció 67 vegades millor que amb el procés "*off-line*".

Desena. Les concentracions de cafeïna trobades en les mostres d'aigua de la Riera de Tossa, Riu Ridaura i Riera Aubí es troben entre el límit de detecció i uns pocs $\mu g \cdot L^{-1}$ i aquesta substància es detecta en poques ocasions. A partir de les mostres analitzades es pot concloure que l'aportació de cafeïna a aquestes aigües naturals per part de les EDARs que hi aboquen és negligible. Els resultats del seguiment de cafeïna en les

diferents etapes del tractament de les aigües residuals indiquen que en el tractament biològic per fangs activats es produeix una eliminació superior al 99% de la cafeïna que entra a la planta i no s'observen diferències en l'eficàcia de l'eliminació entre les EDARs d'Empuriabrava, Pals i Palamós.