



# UNCUYO

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

**TESIS DE DOCTORADO**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS  
ANALÍTICAS VERDES PARA LA DETERMINACIÓN DE  
CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES Y  
EMERGENTES EN EL AMBIENTE**

**NOMBRE DE LA TESISISTA: SABRINA BELÉN MAMMANA**

**NOMBRE DE LA DIRECTORA: JORGELINA CECILIA ALTAMIRANO**

**NOMBRE DE LA CODIRECTORA: ALEJANDRA BEATRIZ CAMARGO**

**MENDOZA, FEBRERO 2020**



**UNCUYO**  
**UNIVERSIDAD**  
**NACIONAL DE CUYO**

**UNIDAD ACADÉMICA: FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**TESIS DE DOCTORADO**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS  
ANALÍTICAS VERDES PARA LA DETERMINACIÓN DE  
CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES Y  
EMERGENTES EN EL AMBIENTE**

**DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**NOMBRE DE LA TESISISTA: SABRINA BELÉN MAMMANA**

**NOMBRE DE LA DIRECTORA: JORGELINA CECILIA ALTAMIRANO**

**NOMBRE DE LA CODIRECTORA: ALEJANDRA BEATRIZ CAMARGO**

**MENDOZA, FEBRERO 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional. A mis hermanos Nicolás, Mariana y Giuliana, por acompañarme y aconsejarme en cada momento y darme fuerzas para seguir adelante y superar esas trabas que se presentaron en el camino. A mis sobrinos Alma, Pilar, Franco, Bruno, Camila y Matilda por alegrarme los días y darme luz. Un especial saludo a Rodrigo, por acompañarme en esta última etapa ¡te amo!

A mis primas Claudia y Romi por nuestros jueves intachables, por estar siempre y festejar cada logro, por acompañarme en cada derrota, pero principalmente, por ser parte de mi vida. A mi madrina y primas Juli y Clari por estar siempre y compartir conmigo.

A mis amigos Rubén, Dayi, Mati, Bibi, Chari por cada una de nuestras aventuras, en especial a mi amigo Matías, que gracias a él hoy estoy en este camino de la ciencia y del descubrimiento, gracias amigo por estar siempre, además de ser mi gran confidente al escucharme y aconsejarme siempre. A mi amigo Juan por hacerme reír hasta en los peores momentos. Gracias a mi gran amiga Mari por ser siempre parte de mi vida, mi gran amiga de la vida.

A mis grandes amigas de anécdotas y vivencias Florencia y Emilia, son parte de mi vida por siempre y estoy agradecida que nos hayamos cruzado. ¡Attraversiamo amigas mías!

Un especial agradecimiento a mi directora Jorgelina Altamirano, por confiar en mí y permitirme trabajar en su grupo de investigación. Gracias a mis compañeros de laboratorio Gustavo, Belén, Juan y Esteban por brindarme ayuda siempre y, en especial, a Paula: siempre vas a estar presente en mis agradecimientos.

Un agradecimiento especial a Adrián Covaci (Universidad de Amberes) por acobijarme en su grupo de trabajo y por darme la oportunidad de vivir una experiencia única con gente increíble. Gracias Giulia Poma y Michiel Bastiaensen por ayudarme en el trabajo de mesada durante mi estadía en Bélgica.

Gracias a cada una de las personas que fueron y son parte de mi vida y que me ayudaron aportando su granito de arena.

## **RESUMEN**

Actualmente, una porción de los contaminantes orgánicos persistentes, como los éteres de difenilo polibromados (PBDE); y los contaminantes emergentes, como los pesticidas organofosforados (OP) y los retardantes de llama fosforados (PFR) se liberan constantemente al medio ambiente, dando lugar a efectos adversos en el medio ambiente y la salud humana. Estos contaminantes se encuentran en el ambiente en concentraciones traza, por lo que, determinarlos requiere metodologías analíticas sensibles y selectivas. En la presente Tesis de Doctorado se desarrollaron 2 metodologías analíticas para la determinación de OP y PBDE en muestras de agua y cabello y se colaboró con una metodología analítica para determinar PBDE en muestras de leche materna que permitieron dar información sobre sus niveles de concentración en muestras de Mendoza. Asimismo, se estudió la presencia y niveles de 17 PFR y 12 de sus metabolitos en muestras de aguas residuales de Argentina. Para ello, se propusieron dos metodologías analíticas: 1) una digestión enzimática en muestras de cabello humano seguido de una microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por tensioactivo para determinar 4 PBDE por GC-ECD, 2) una extracción coacervativa asistida por coprecipitación para determinar 5 OP en muestras de agua para consumo humano por HPLC-UV y en colaboración con el grupo LQA: una extracción asistida por ultrasonido seguido de extracción por punto nube y retro-extracción asistida por ultrasonido para determinar 4 PBDE en muestras de leche materna por GC-ECD. Bajo condiciones experimentales optimizadas las metodologías presentaron  $r > 0,94$ ; LOD entre  $0,0001-0,50 \text{ ng g}^{-1}$  para PBDE en muestras de cabello y leche materna y  $0,012-0,083 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para OP en muestras de agua. Los LOQ se encontraron entre  $0,003-0,70 \text{ ng g}^{-1}$  para PBDE en muestras de cabello y leche y  $0,15-0,37 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para OP en muestras de agua. La recuperación se encontró entre 68-101% con  $\text{RSD} < 8,5$  ( $n=3$ ) para los 4 PBDE en cabello y leche y 60,5-99,5% para los 5 OP con  $\text{RSD} < 1,2\%$  ( $n=3$ ) en agua. Se encontró PBDE en 3 de 4 muestras de cabello humano analizadas y OP en las muestras de agua de pozo de El Carrizal. Se concluyó que las 3 metodologías analíticas demostraron ser eficaces para determinar PBDE en muestras de cabello humano y leche materna y OP en muestras de agua para consumo humano. Los estudios de recuperación demostraron la eficiencia para extraer y cuantificar PBDE y OP en muestras de cabello humano, leche materna y agua. Por otro lado, de los 17 PFR determinados, el analito EHDPP fue el PFR más abundante en las dos plantas siguiendo en la lista TBOEP y TPhP. Además, de los 12 metabolitos determinados, BBOEP, EHPHP y DnBP fueron los más abundantes en orden decreciente. Se concluyó que los niveles de concentración de PFR y sus metabolitos se encuentran entre 3-5 veces por debajo de los valores reportados en Bruselas, Amberes, Atenas, Vilna y Ginebra, Europa. El presente trabajo de Tesis Doctoral representó la primera determinación de PBDE en muestras de cabello humano y leche materna en Argentina, la contribución sobre los niveles de concentración de OP en muestras de agua en Mendoza, Argentina y el inicio en la determinación de PFR y sus metabolitos en nuestro país.

El desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral dio origen a la publicación de los siguientes trabajos de investigación en revistas de prestigio internacional y presentación a congresos nacionales e internacionales:

Trabajos publicados o enviados para su publicación:

**Mammana, S.B.**; Berton, P.; Camargo, A.B.; Lascalea, G.E.; Altamirano, J.C. Coprecipitation-assisted coacervative extraction coupled to high-performance liquid chromatography: An approach for determining organophosphorus pesticides in water samples. *Electrophoresis* **38** (9-10) (2017), 1334 – 1343.

**Mammana, S.B.**; Abraham, E. del C.; Camargo, A.B.; Altamirano, J.C. Enzymatic digestion coupled to surfactant assisted-dispersive liquid-liquid microextraction: a mild approach for determining polybrominated diphenyl ethers in human hair samples. Aceptada en ChemistrySelect #201904795.

 Trabajo en proceso de escritura para su publicación:

**Mammana, S.B.**; Abraham, E. del C.; Ríos, J.M.; Ruggeri, M.F., Covaci, A.; Altamirano, J.C. First report of phosphate flame retardants, plasticizers, and their metabolites in wastewater treatment plants from Argentina: occurrence and levels. En proceso de escritura y revisión.

Publicaciones en congresos:

13-15/09/2019: 10<sup>mo</sup> Congreso Argentino de Química Analítica, La Pampa, Argentina

**S.B. Mammana**, A.B. Camargo, J.C. Altamirano\*. “Diseño experimental aplicado al desarrollo de una metodología analítica verde para monitorear éteres de difenilo polibromados en muestras de cabello humano”

25-26/04/2018: 11<sup>th</sup> Network Conference on Persistent Organic Pollutants, Sede Birmingham, UK

**S.B. Mammana**, D.A. Locatelli, A.B. Camargo, J.C. Altamirano\*. “Proteolytic digestion of human hair samples as an alternative to conventional digestion for PBDE analysis”

7-10/11/2017: 9<sup>no</sup> Congreso Argentino de Química Analítica, Río Cuarto, Argentina

**S.B. Mammana\***, A.B. Camargo, J.C. Altamirano. “Proteolytic digestion in human hair samples as alternative to the conventional digestions”

7-10/05/2017: 8<sup>th</sup> International Symposium on Flame Retardants, Sede York, UK

**S.B. Mammana**, P. Berton, A.B. Camargo, G.E. Lascalea, J.C. Altamirano\*. “Co-precipitation-assisted coacervative extraction coupled to high-performance liquid chromatography: an approach for determining organophosphorus compounds in water samples”

3-6/11/2015: 8<sup>vo</sup> Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata, Argentina

**S.B. Mammana\*** y J. Altamirano. “Determinación de vitamina B12 en suplementos vitamínicos y fármacos por HPLC para la enseñanza en química analítica”

**S.B. Mammana\***, A. Camargo y J. Altamirano. “Extracción coacervativa asistida por coprecipitación. Análisis de pesticidas organofosforados en agua mediante HPLC”

Por otro lado, de las colaboraciones realizadas en el grupo, surgieron los siguientes trabajos de investigación en revistas de prestigio internacional y congresos:

Berton, P.; **Mammana, S.B.**; Locatelli, D.A.; Lana, N.B.; Camargo, A.B.; Altamirano, J.C. Determination of polybrominated diphenyl ethers in milk samples. Development of green extraction coupled techniques for sample preparation. *Electrophoresis* **38** (3-4) (2016), 460 – 468. ISSN: 0173-0835.

Abraham, E. del C.; D’Ángelo, J.A., **Mammana, S.B.**; Lascalea, G.E.; Altamirano, J.C. Recycling of histological xylol: A chemometric approach. *ChemistrySelect* **4** (36) (2019), 10856 – 10862. .

25-28/10/2016: XXXI Congreso Argentino de Química, Asociación Química Argentina, CABA, Argentina

**S.B. Mammana\***, P. Berton, E. Koch, N. Ciocco, R.G. Wuilloud, J.C. Altamirano. “Desarrollo de una metodología analítica eco-amigable para la determinación de BDE-209 en tejidos de caracol manzana, *Pomacea canaliculata*, por HPLC-UV”.

5-6/05/2016: I Jornadas de Estudiantes de Ciencias Exactas y Naturales, FCEN-UNCuyo, Mendoza, Argentina

**S.B. Mammana\***, D.S. Drajlín Gordon, J.N. Aranibar, G.I. Prieto y J.C. Altamirano. “Acidificación oceánica: Propuesta áulica empleando levaduras para visualización de la temática curricular”

11/11/2015: XXIV Jornadas de Investigación y VI Jornadas de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

P. Berton, D. Locatelli, **S.B. Mammana\***, A. Camargo y J. Altamirano. “Técnica de preparación de muestra novedosa para la determinación de PBDE en muestras de leche”

## Listado de abreviaturas y acrónimos

<b>2IPDPP</b>	<i>2-isopropylphenyl diphenyl phosphate</i>	2-isopropilfenil difenil fosfato
<b>3-HO-TBOEP</b>	<i>bis (2-butoxyethyl) 3'-hydroxy-2-butoxyethyl phosphate</i>	Bis (2-butoxietil) 3'-hidroxi-2-butoxietil fosfato
<b>3D-GA</b>	<i>three dimensional graphene aerogel</i>	aerogel de grafeno en tres dimensiones
<b>4HO-DPhP</b>	<i>4-hydroxyphenyl phenyl phosphate</i>	4-hidroxifenil fenil fosfato
<b>4IPDPP</b>	<i>4-isopropylphenyl diphenyl phosphate</i>	4-isopropilfenil difenil fosfato
<b>5-HO-EHDPHPI/5-OH-EHDP</b>	<i>2-ethyl-5-hydroxyhexyl diphenyl phosphate</i>	2-etil-5-hidroxihexil difenil fosfato
<b>ABS</b>	<i>acrylonitrile butadiene styrene</i>	Acrilonitrilo butadieno estireno
<b>ACH</b>	<i>acetylcholinesterase</i>	enzima acetilcolinesterasa
<b>APCI</b>	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>	ionización química a presión atmosférica
<b>B4IPPPP</b>	<i>bis(4-ter-butylphenyl) phenyl phosphate</i>	bis(4-ter-butilfenil) fenil fosfato
<b>BBD</b>	<i>Box-Behnken design</i>	Diseño Box Behnken
<b>BBOEHEP</b>	<i>bis(2-butoxyethyl) 2-hydroxyethyl phosphate</i>	bis(2-butoxietil) 2-hidroxietil fosfato
<b>BBOEP</b>	<i>bis 2-butoxyethyl phosphate</i>	bis 2-butoxietil fosfato
<b>BCEP</b>	<i>bis(2-chloroethyl) phosphate</i>	bis(2-cloroetil) fosfato
<b>BCIPHIPP</b>	<i>bis(1-chloro-2-propyl) 1-hydroxy-2-propyl phosphate</i>	bis(1-cloro-2-propil) 1-hidroxi-2-propil fosfato
<b>BCIPP</b>	<i>Bis(2-chloro-isopropyl) phosphate</i>	bis(2-cloro-isopropil) fosfato
<b>BDCIPP</b>	<i>Bis(1,3-dichloropropan-2-yl) phosphate</i>	bis(1,3-dicloropropan-2-il) fosfato
<b>BFR</b>	<i>brominated flame retardants</i>	retardantes de llama bromados
<b>CAE</b>	<i>coacervative extraction</i>	extracción coacervativa
<b>CCD</b>	<i>central composite design</i>	diseño central compuesto
<b>CI</b>	<i>chemical ionization</i>	ionización química
<b>CMC</b>	<i>critical micelle concentration</i>	concentración micelar crítica
<b>CPE</b>	<i>cloud point extraction</i>	extracción por punto nube
<b>CPF</b>	<i>chlorpyrifos</i>	clorpirifos
<b>CUP</b>	<i>current-use pesticides</i>	pesticidas de uso corriente
<b>DAD</b>	<i>diode array detector</i>	detector de arreglo de diodos
<b>DCM</b>	<i>dichloromethane</i>	diclorometano
<b>DDT</b>	<i>dichloro diphenyl trichloroethane</i>	dicloro difenil tricloroetano
<b>DEM</b>		diseños de experimentos multivariados
<b>DES</b>	<i>deep eutectic solvent</i>	solventes eutécticos
<b>DFFITS</b>	<i>difference in fits</i>	diferencia entre prueba de valores ajustados
<b>D</b>	<i>desirability</i>	deseabilidad
<b>DLLME</b>	<i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>	microextracción líquido-líquido dispersiva
<b>DnBP</b>	<i>dibutyl phosphate</i>	dibutil fosfato
<b>DPhP</b>	<i>diphenyl phosphate</i>	difenil fosfato

<b>DSPE</b>	<i>dispersive solid phase extraction</i>	extracción en fase sólida dispersa
<b>EC</b>	<i>emerging contaminants</i>	contaminantes emergentes
<b>ECD</b>	<i>electron capture detector</i>	detector con captura de electrones
<b>ECNI</b>	<i>electron capture negative ionization</i>	ionización negativa de captura de electrones
<b>ED</b>	<i>enzymatic digestion</i>	digestión enzimática
<b>EF</b>	<i>enrichment factor</i>	factor de enriquecimiento
<b>EHDP/PHDP</b>	<i>2-ethylhexyl phosphate</i>	2-etilhexil difenil fosfato
<b>EHPhP/PHPP</b>	<i>2-ethylhexyl phenyl phosphate</i>	2-etilhexil fenil fosfato
<b>EI</b>	<i>electron impact</i>	impacto de electrones
<b>EE</b>	<i>ethyl ether</i>	éter etílico
<b>FE</b>	<i>fenitrothion</i>	fenitrotión
<b>FPD</b>	<i>flame photometric detector</i>	detector fotométrico de llama
<b>GC</b>	<i>gas chromatography</i>	cromatografía de gases
<b>GPC</b>	<i>gel-permeation chromatography</i>	cromatografía por permeación en gel
<b>GU</b>	<i>guthion</i>	gutión
<b>HBCD</b>	<i>hexabromocyclodecane</i>	Hexabromociclodecano
<b>HCB</b>	<i>hexachlorobenzene</i>	hexaclorobenceno
<b>HCH</b>	<i>hexachlorocyclohexane</i>	hexaclorociclohexano
<b>HF-LPME</b>	<i>hollow-fiber liquid phase microextraction</i>	microextracción líquida con fibra hueca
<b>HPLC</b>	<i>high-performance liquid chromatography</i>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>IL</b>	<i>ionic liquid</i>	los líquidos iónicos
<b>IS</b>	<i>internal standard</i>	estándar interno
<b>LC</b>	<i>liquid chromatography</i>	cromatografía de líquidos
<b>LLE</b>	<i>liquid-liquid extraction</i>	extracción líquido-líquido
<b>LOD</b>	<i>limit of detection</i>	límite de detección
<b>LOQ</b>	<i>limit of quantification</i>	límite de cuantificación
<b>LPME</b>	<i>liquid-phase microextraction</i>	microextracción en fase líquida
<b>LRAT</b>	<i>large range atmospheric transport</i>	Transporte atmosférico de largo alcance
<b>MAE</b>	<i>microwave-assisted extraction</i>	extracción asistida por microondas
<b>MD</b>	<i>magnetic dispersion</i>	dispersión magnética
<b>MFGM</b>	<i>milk fat globule membranes</i>	membrana de los glóbulos de grasa de la leche
<b>MS</b>	<i>mass spectrometry</i>	espectrometría de masas
<b>MSPD</b>	<i>matrix solid-phase dispersion</i>	dispersión de la matriz en la fase sólida
<b>MSR</b>		metodologías de superficie de respuesta
<b>MTD</b>	<i>methidathion</i>	metidatión
<b>MWCNT</b>	<i>multi-walled carbon nanotubes</i>	nanotubos de carbono de paredes múltiples
<b>C<sub>6</sub></b>	<i>n-hexane</i>	n-hexano
<b>NPD</b>	<i>nitrogen phosphorus detector</i>	detector de fósforo nitrógeno

<b>OCP</b>	<i>organochlorine pesticides</i>	pesticidas organoclorados
<b>OP</b>	<i>organophosphorus pesticides</i>	pesticidas organofosforados
<b>PA</b>	<i>parathion</i>	paratión
<b>PBDE</b>	<i>polybrominated diphenyl ethers</i>	éteres de difenilo polibromados
<b>PCB</b>	<i>polychlorinated biphenyls</i>	bifenilos policlorados
<b>PCDD/F</b>	<i>polychlorinated dibenzodioxins/furans</i>	policlorodibenzodioxina/furano
<b>PFOS</b>	<i>perfluorooctanesulfonic acid</i>	ácido perfluorooctano sulfónico
<b>PFOSF</b>	<i>perfluorooctanesulfonyl fluoride</i>	fluoruro de perfluorooctano sulfonilo
<b>PFR</b>	<i>phosphorus flame retardants</i>	retardantes de llama fosforados
<b>PLE</b>	<i>pressurized liquid extraction</i>	extracción con líquidos presurizados
<b>POP</b>	<i>persistent organic pollutant</i>	contaminante orgánico persistente
<b>PPCP</b>	<i>pharmaceutical and personal care products</i>	productos farmacéuticos y de cuidado personal
<b>PTV</b>	<i>programmed temperature vaporizing</i>	vaporización a temperatura programada
<b>QC</b>	<i>quality control</i>	control de calidad
<b>QuEChERS</b>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro
<b>R</b>	<i>recovery</i>	recuperación
<b>RP</b>	<i>reverse phase</i>	fase reversa
<b>RR</b>	<i>relative response</i>	Respuesta relativa
<b>RSD</b>	<i>relative standard deviation</i>	desviación estándar relativa
<b>SA-DLLME</b>	<i>surfactant assisted-dispersive liquid-liquid microextraction</i>	microextracción líquido-líquido dispersive asistida por tensoactivo
<b>SBSE</b>	<i>stir-bar sorptive extraction</i>	extracción sortiva con barra de agitación
<b>SDME</b>	<i>single-drop microextraction</i>	Microextracción con gota única
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecylsulfate</i>	dodecilsulfato de sodio
<b>SFO</b>	<i>solidifying floating organic droplet</i>	solidificación de una gota orgánica flotante
<b>SPE</b>	<i>solid-phase extraction</i>	extracción en fase sólida
<b>T2IPPP</b>	<i>Tris(2-isopropylphenyl) phosphate</i>	Tris(2-isopropilfenil) fosfato
<b>T35DMPP</b>	<i>Tris(3,5-dimethylphenyl) phosphate</i>	Tris(3,5-dimetilfenil) fosfato
<b>TBOEP/ TBEP/ TBOP</b>	<i>tris(2-butoxyethyl) phosphate</i>	Tris(2-butoxietyl) fosfato
<b>TCEP/ TCIEP</b>	<i>tris(2-chloroethyl) phosphate.</i>	Tris(2-cloro-etil) fosfato
<b>TCIPP/ TCPP</b>	<i>tris(3-chloro-isopropyl) phosphate</i>	Tris(3-cloro-isopropil) fosfato
<b>TDCIPP/ TDCPP/ TDCP</b>	<i>Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate</i>	Tris(1,3-dicloro-2-propil) fosfato
<b>TEHP</b>	<i>tris(2-ethylhexyl) phosphate</i>	Tris(2-etilhexil) fosfato
<b>TMTP/m-TCP</b>	<i>tri-m-tolyl phosphate</i>	Tri-m-tolil fosfato
<b>TnBP/ TBP/ TBPA</b>	<i>Tributyl phosphate</i>	Tributil fosfato
<b>TOTP/o-TCP</b>	<i>tri-o-tolyl phosphate</i>	Tri-o-tolil fosfato
<b>TPhP/TPP</b>	<i>Triphenyl phosphate</i>	Trifenil fosfato

<b>TPRP/TPrP</b>	<i>tripropyl phosphate</i>	Tripropil fosfato
<b>TPTP/p-TCP</b>	<i>tri-p-tolyl phosphate</i>	Tri-p-tolil fosfato
<b>UAE</b>	<i>ultrassound-assisted extraction</i>	extracción asistida por ultrasonido
<b>UASEME</b>	<i>Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction</i>	Microextracción de emulsificación mejorada con tensioactivos asistida por ultrasonido
<b>VA</b>	<i>vortex-assisted</i>	asistido por vórtice
<b>WBE</b>	<i>wastewater-based epidemiology</i>	epidemiología basada en aguas residuales
<b>WWTP</b>	<i>wastewater treatment plant</i>	plantas de tratamiento de aguas residuales



*A mi familia*

# Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	11.1
CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES	
21.1.1	
<i>CONVENIO DE ESTOCOLMO</i>	
21.1.2	
<i>APLICACIÓN DEL CONVENIO DE ESTOCOLMO SOBRE POP EN LA REPÚBLICA ARGENTINA</i>	
41.1.3	
<i>ÉTERES DE DIFENILO POLIBROMADOS</i>	
5BIODISPONIBILIDAD, BIOACUMULACIÓN Y TOXICIDAD DE LOS PBDE	
7OCURRENCIA DE LOS PBDE EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO	
91.2	
CONTAMINANTES EMERGENTES	
131.2.1	
<i>PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS</i>	
14BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD DE LOS OP	
14OCURRENCIA DE LOS OP EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO	
161.2.2	
<i>RETARDANTES DE LLAMA FOSFORADOS</i>	
18BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD DE LOS PFR	
21OCURRENCIA DE LOS PFR Y SUS METABOLITOS EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO	
211.3	
DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS VERDES	
23LOS 12 PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE	
231.3.1	
<i>ETAPA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS</i>	
24MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA	
25MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA	
25EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ECOAMIGABLES	
26EXTRACCIÓN CON TENSIOACTIVOS	
26TÉCNICAS PARA ASISTIR EXTRACCIONES	
28EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	
281.3.2	
<i>ETAPA DE LIMPIEZA DEL EXTRACTO</i>	
291.3.3	
<i>ANÁLISIS INSTRUMENTAL: SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS</i>	

	301.3.4
<i>DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA</i>	
	381.3.5
<i>EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS DATOS Y VALIDACIÓN</i>	
40	SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD
41	PRECISIÓN Y EXACTITUD
	41
	CALIBRACIÓN
	43
	ESTÁNDAR INTERNO
	43
	LÍMITE DE DETECCIÓN
	43
	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN
	44
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
45	<b>CAPÍTULO II: DETERMINACIÓN DE PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO</b>
	482.1
	INTRODUCCIÓN
	492.2
	EXPERIMENTAL
	512.2.1
	REACTIVOS Y SOLVENTES
	512.2.2
	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA Y SOFTWARE
52	CROMATÓGRAFO DE GASES CON DETECCIÓN POR CAPTURA DE ELECTRONES
	522.2.3
	MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS
	522.2.4
	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
	522.2.5
	DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES
	542.2.6
	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD ANALÍTICA/CONTROL DE CALIDAD
	552.3
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN
	562.3.1
	ESCISIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DE LA QUERATINA
	572.3.2
	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA ASISTIDA POR TENSIOACTIVO
	572.3.3
	EFEECTO DEL TIPO Y COMPOSICIÓN DEL SOLVENTE DE ELUCIÓN EN LA LIMPIEZA DEL EXTRACTO

	622.4
RENDIMIENTO ANALÍTICO Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	
	632.5
COMPARACIÓN DE LA ED-SA-DLLME-GC-ECD CON OTRAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO	
	682.6
CONCLUSIONES PARCIALES	
<b>71 CAPÍTULO III: DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS DE AGUA</b>	
	723.1
INTRODUCCIÓN	
	733.2
EXPERIMENTAL	
	753.2.1
REACTIVOS Y SOLVENTES	
	753.2.2
INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA Y SOFTWARE	
76 CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV	
76 ESPECTROFOTÓMETRO UV	
	763.2.3
MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS	
	763.2.4
EXTRACCIÓN COACERVATIVA ASISTIDA POR COPRECIPITACIÓN	
	773.3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
	793.3.1
PRECURSOR DEL AGENTE DE COPRECIPITACIÓN Y EFECTO EL pH	
	793.3.2
CONCENTRACIÓN Y ORDEN DE ADICIÓN DE $Al_2(SO_4)_3$ Y SDS	
	813.3.3
EFECTO DEL TIEMPO DE AGITACIÓN	
	843.3.4
VARIABLES COMPLEMENTARIAS: TIEMPO Y TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN Y TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN	
	853.3.5
ACONDICIONAMIENTO DE LA FASE COACERVATO PARA EL ANÁLISIS POR HPLC-UV	
	873.4
RENDIMIENTO ANALÍTICO Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	
	883.5
COMPARACIÓN DE COP-CAE-HPLC-UV CON OTRAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR OP EN	

MUESTRAS DE AGUA	933.6
	CONCLUSIONES PARCIALES
<b>97</b> CAPÍTULO IV: PRIMER REPORTE DE RETARDANTES DE LLAMA FOSFORADOS, PLASTIFICANTES Y SUS METABOLITOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN ARGENTINA	994.1
	INTRODUCCIÓN
	1004.2
	EXPERIMENTAL
	1024.2.1
	<i>MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS</i>
	1024.2.2
	<i>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS</i>
	104FRACCIÓN DE BIOSÓLIDOS
	104FRACCIÓN DE SOBRENADANTES
	1044.2.3
	<i>ANÁLISIS DE LOS DATOS</i>
	1054.3
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN
	1064.3.1
	<i>CONCENTRACIÓN DE PFR Y PLASTIFICANTES EN LA FRACCIÓN DE BIOSÓLIDOS</i>
	1064.3.2
	<i>CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS DE PFR EN LA FRACCIÓN DE SOBRENADANTES</i>
	1074.3.3
	<i>CARGA NORMALIZADA DE LA POBLACIÓN</i>
	1114.4
	CONCLUSIONES PARCIALES
	<b>112</b> CONCLUSIONES GENERALES
	<b>115</b> ANEXOS
	119ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE PBDE EN MUESTRAS DE LECHE HUMANA
	1205.1
	INTRODUCCIÓN
	1205.2
	EXPERIMENTAL
	1215.2.1
	<i>Reactivos y solventes</i>
	1215.2.2
	<i>Cromatógrafo de gases con detección por captura de electrones</i>
	1225.2.3

	<i>Muestreo y acondicionamiento de las muestras</i>	1225.2.4
	<i>Preparación de las muestras</i>	1225.2.5
	<i>Diseño experimental y optimización de las variables que afectan al sistema</i>	1235.3
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	1255.3.1
	<i>Tipo de solvente de lixiviación para la extracción asistida por ultrasonido</i>	1265.3.2
	<i>Técnica UAE</i>	1275.3.3
	<i>Técnicas CPE-UABE</i>	1305.4
	RENDIMIENTO ANALÍTICO Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	1375.5
COMPARACIÓN DE UAE-CPE-UABE-GC-ECD CON OTRAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE LECHE HUMANA		1415.6
	CONCLUSIONES PARCIALES	145
	ANEXO 2: Material suplementario del capítulo IV.	1476.1
	OCURRENCIA DE PFR Y SUS METABOLITOS EN AGUAS RESIDUALES DE ARGENTINA	1486.1.1
	<i>Figura A.1.: Estructuras químicas de los PFR nombrados en el capítulo VI.</i>	1496.1.2
	<i>Tabla A.1.: Biosólidos obtenidos de la centrifugación de las muestras de aguas residuales y cantidad de cobre en polvo agregado por cada muestra para la etapa de preparación de muestras</i>	1506.1.3
<i>Análisis instrumental de las metodologías analíticas utilizadas en el capítulo III para determinar PFR y sus metabolitos y sus LOD y LOQ</i>	150	Determinación de PFR en la fracción de biosólidos
	150	Reactivos y soluciones
	150	Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas
	151	Determinación de metabolitos de PFR en la fracción de sobrenadantes
	152	Reactivos y soluciones
	152	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
	152	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
		155

## Tablas

TABLA 1. LISTADO DE LAS ENMIENDAS DEL CONVENIO DE ESTOCOLMO SOBRE POP PBDE FRECUENTEMENTE ENCONTRADOS EN EL AMBIENTE ABIÓTICO	3	TABLA 2. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DE LOS PBDE FRECUENTEMENTE ENCONTRADOS EN EL AMBIENTE ABIÓTICO	8
TABLA 3. OCURRENCIA DE LOS PBDE EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO	15	TABLA 4. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DE LOS OP FRECUENTEMENTE USADOS EN MENDOZA, ARGENTINA.	16
TABLA 5. OCURRENCIA DE LOS OP EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO.	19	TABLA 6. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DE LOS PFR [76].	19
TABLA 7. OCURRENCIA DE LOS PFR Y SUS METABOLITOS EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO.	21	TABLA 8. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y SUS CIFRAS DE MÉRITO ANALÍTICO PARA DETERMINAR PBDE Y OP EN MUESTRAS BIÓTICAS Y ABIÓTICAS.	33
TABLA 9. VARIABLES Y NIVELES (VALORES) EVALUADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONADO DE LA ED-SA-DLLME	59	TABLA 10. DISEÑO BOX BEHNKEN PARA ED-SA-DLLME	60
TABLA 11. FIGURAS DE MÉRITO ANALÍTICO DE LA METODOLOGÍA ED-SA-DLLME-GC-ECD PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO.	66	TABLA 12. ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES DE LA METODOLOGÍA ED-SA-DLLME-GC-ECD PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO.	68
TABLA 13. COMPARACIÓN CON OTRAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO	70	TABLA 14. FIGURAS DE MÉRITO ANALÍTICO DE LA METODOLOGÍA COP-CAE-HPLC-UV PARA DETERMINAR OP EN MUESTRAS DE AGUA.	90
TABLA 15. ESTUDIO DE RECUPERACIÓN Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES DE LA METODOLOGÍA COP-CAE-HPLC-UV PARA DETERMINAR OP EN MUESTRAS DE AGUA.	91	TABLA 16. COMPARACIÓN DE LA METODOLOGÍA COP-CAE-HPLC-UV CON OTRAS METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR OP EN MUESTRAS DE AGUA.	96
TABLA 17. MEDIA, MEDIANA (ENTRE PARÉNTESIS), ERROR ESTÁNDAR Y CONCENTRACIÓN MÍN-MÁX DE LOS PFR EN LAS WWTP A Y B DEL OASIS URBANO OCCIDENTAL DE ARGENTINA.	109	TABLA 18. MEDIA, MEDIANA (ENTRE PARÉNTESIS), ERROR ESTÁNDAR Y CONCENTRACIÓN MÍN-MÁX DE LOS METABOLITOS EN LAS WWTP A Y B DEL OASIS URBANO OCCIDENTAL DE ARGENTINA.	110
TABLA 19. CARGA NORMALIZADA DE LA POBLACIÓN EN MG POR DÍA CADA 1000 HABITANTES.	113	TABLA 20. VARIABLES Y NIVELES (VALORES) EVALUADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL DE LA TÉCNICA UAE.	128
TABLA 21. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA LA TÉCNICA UAE	129	TABLA 22. VARIABLES AND LEVELS (VALUES) EVALUATED IN FACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN OF CPE-UABE.	132
TABLA 23. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA CPE-UABE	134	TABLA 24. FIGURAS DE MÉRITO ANALÍTICO, ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES DE LA METODOLOGÍA UAE-CPE-UABE-GC-ECD PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE LECHE HUMANA.	140
TABLA 25. COMPARACIÓN DE UAE-CPE-UABE-GC-ECD CON OTRAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE LECHE HUMANA	144		

## Figuras

FIGURA 1. MECANISMO DE ACCIÓN QUÍMICO POR CAPTURA DE RADICALES DE LOS RETARDANTES DE LLAMA BROMADOS.	6
FIGURA 2. ESQUEMA DE LA CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL DE LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA.	24

FIGURA 3. FORMAS DE AGREGACIÓN DE LAS MICELAS, DEPENDIENDO DE SU CMC Y EL MEDIO EN EL QUE SE ENCUENTRAN.	25
FIGURA 4. ESQUEMA DE LOS PASOS DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DESARROLLADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PBDE MEDIANTE ED-SA-DLLME-GC-ECD.	51
FIGURA 5. GRÁFICAS DE PARETO DEL ESTUDIO DE ED-SA-DLLME. LAS VARIABLES Y SUS NIVELES ESTÁN DETALLADOS EN LA TABLA 9.	56
FIGURA 6. GRÁFICAS DE DESEABILIDAD DE LA RESPUESTA ANALÍTICA USANDO BBD OBTENIDA POR TRAZADO DE A) TEMPERATURA DE DIGESTIÓN (°C) VS. TIEMPO DE DIGESTIÓN (MIN), B) CONCENTRACIÓN DE SDS (% V/P) VS. VOLUMEN DE SOLVENTE EXTRACTIVO [μL] Y C) VOLUMEN DE SOLVENTE EXTRACTIVO [μL] VS. CONCENTRACIÓN DE PROTEINASA K [U ML <sup>-1</sup> ]	58
FIGURA 7. RESPUESTA RELATIVA (%) DE LOS PBDE FRENTE A LA COMPOSICIÓN DE SOLVENTES DE ELUCIÓN EN LA ETAPA DE LIMPIEZA DEL EXTRACTO.	60
FIGURA 8. CROMATOGRAMA GC-ECD DE UNA MUESTRA DE CABELLO A) CON AGREGADO DE 5 NG G <sup>-1</sup> DE PBDE E IS Y B) SIN AGREGADO DE PBDE PERO CON IS. LAS CONDICIONES METODOLÓGICAS ESTÁN DESCRIPTAS EN LA SECCIÓN 2.2.4.	62
FIGURA 9. DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA DE COP-CAE PREVIO A LA DETERMINACIÓN POR HPLC-UV.	73
FIGURA 10. DISTINTAS ESPECIES DE ALUMINIO REPRESENTADAS EN FUNCIÓN DEL VALOR DE PH DE LA SOLUCIÓN EN LA QUE SE ENCUENTRA. LA ESPECIE RESALTADA EN AMARILLO ES LA FORMADA EN ESTE TRABAJO.	74
FIGURA 11. EFECTO DEL PH DE EXTRACCIÓN SOBRE LA RESPUESTA RELATIVA (%) DE CADA OP.	75
FIGURA 12. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE: A) Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> B)SDS, SOBRE LA RESPUESTA RELATIVA (%) DE CADA OP.	77
FIGURA 13. EL EFECTO DEL TIEMPO DE AGITACIÓN SOBRE LA RESPUESTA RELATIVA (%) DE LOS OP.	78
FIGURA 14. EFECTO DE A) EL TIEMPO DE EXTRACCIÓN Y B) EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA RESPUESTA RELATIVA (%) DE LOS OP.	80
FIGURA 15. CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE AGUA DE POZO PROVENIENTE DE EL CARRIZAL, MENDOZA A) CON AGREGADO DE OP A 200 NG ML <sup>-1</sup> Y B) SIN AGREGADO DE ESTÁNDAR.	85
FIGURA 16. ESQUEMA DEL DISPOSITIVO DE MUESTREO (MUESTREADOR) DESDE LA ENTRADA DE LA PLANTA. EL DISPOSITIVO FUE ARMADO POR LOS INTEGRANTES DEL GRUPO DE TRABAJO LQA Y CUENTA CON UN BALDE EN UN EXTREMO PARA TOMAR EL AGUA RESIDUAL, DESDE DONDE LUEGO SE TOMAN LOS 50 ML DE MUESTRA CON LA JERINGA.	93
FIGURA 17. GRÁFICAS DE LA CONTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS ANALITOS DE CADA GRUPO A CADA PLANTA (A Y B). A: PFR, B. SUS METABOLITOS.	97
FIGURA 18. ESQUEMA DE LOS PASOS DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DESARROLLADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PBDE EN MUESTRAS DE LECHE MEDIANTE UAE-CPE-UABE-GC-ECD.	111
FIGURA 19. EFECTO DE LOS DIFERENTES SOLVENTES PARA LIXIVIACIÓN SOBRE LA RESPUESTA RELATIVA DE LOS PBDE. LA METODOLOGÍA ANALÍTICA UTILIZADA ESTÁ DESCRIPTA EN LA SECCIÓN 5.2.4. CONDICIONES DE CPE-UABE: 1 ML TRITÓN X-114 100 G L <sup>-1</sup> , 0,1 ML NaCl 359 G L <sup>-1</sup> , 30 MIN DE TIEMPO DE EXTRACCIÓN A 70 °C; UABE: 250 μL ISOCTANO, 20 MIN.	114
FIGURA 20. GRÁFICAS DE PARETO PARA LA TÉCNICA UAE ESTUDIADA. LAS VARIABLES Y SUS NIVELES (VALORES) ESTÁN DETALLADOS EN LA TABLA 25. CONDICIONES DE TRABAJO PARA CPE-UABE: 1ML TRITÓN X-114 100 G L <sup>-1</sup> , 0,1 ML NaCl 359 G L <sup>-1</sup> , 30 MIN DE TIEMPO DE EXTRACCIÓN A 70 °C; UABE: 250 μL ISOCTANO, 20 MIN. CONCENTRACIÓN DE PBDE: 5 NG G <sup>-1</sup> .	116
FIGURA 21. RESPUESTA ANALÍTICA USANDO EL CCD OBTENIDO DEL TRAZADO DE: TIEMPO DE SONICADO (MIN) VS VOLUMEN DE SOLVENTE DE LIXIVIACIÓN (ML) PARA LA ETAPA DE UAE.	118
FIGURA 22. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA TÉCNICA DE RETRO-EXTRACCIÓN SOBRE LA RESPUESTA RELATIVA DE LOS PBDE. LA METODOLOGÍA ANALÍTICA ESTÁ DESCRIPTA EN LA SECCIÓN 5.2.4.	119

- FIGURA 23. GRÁFICAS DE PARETO PARA LAS TÉCNICAS CPE-UABE ESTUDIADA. LAS VARIABLES Y SUS NIVELES (VALORES) ESTÁN DETALLADOS EN LA TABLA 23. CONDICIONES DE TRABAJO PARA UAE: TIEMPO DE LIXIVIACIÓN: 25 MIN, ETAPAS DE LIXIVIACIÓN: 3 (DOS INTERRUPCIONES, CON 1 MINUTO DE DESCANSO ENTRE CADA CICLO), VOLUMEN TOTAL DE SOLVENTE DE LIXIVIACIÓN: 3 ML ETAPAS SUCESIVAS DE LIXIVIACIÓN: 2. CONCENTRACIÓN DE PBDE: 5 NG G<sup>-1</sup>. 120
- FIGURA 24. RESPUESTA ANALÍTICA USANDO EL CCD OBTENIDO DEL TRAZADO DE: A. CONCENTRACIÓN DE TRITÓN X-114 (% P/V) VS CONCENTRACIÓN DE CLNA (% P/V) Y B. CONCENTRACIÓN DE TRITÓN X-114 (% P/V) VS TIEMPO DE EXTRACCIÓN (MIN) PARA LA ETAPA DE CPE-UABE. 122
- FIGURA 25. CROMATOGRAMA DE GC-ECD OBTENIDO DEL ANÁLISIS DE UNA MUESTRA DE LECHE HUMANA A) CON ADICIÓN DE 1 NG G<sup>-1</sup> DE PBDE, B) SIN AGREGADO DE ESTÁNDAR. LAS CONDICIONES METODOLÓGICAS ESTÁN DESCRITAS EN LA SECCIÓN 5.2.4. 124

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1 CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES

Los contaminantes orgánicos persistentes denotados como POP (del inglés *persistent organic pollutants*) son un grupo de compuestos químicos que han sido producidos intencional o inadvertidamente e introducidos al medio ambiente [1]. Los POP se han convertido en los compuestos químicos de gran preocupación en las últimas décadas debido a: a) su considerable resistencia a la degradación (química, biológica y fotolítica [2]), b) su capacidad para ser transportado largas distancias desde su fuente, tanto por aire como por las corrientes oceánicas y cuerpos de agua dulce, en un proceso denominado transporte atmosférico de largo alcance o LRAT (del inglés *long range atmospheric transport*), esto significa que parando la producción de estos compuestos no se puede excluir la posibilidad de la continua liberación de los productos finales de las sustancias y su acumulación en el ambiente [2], c) su potencial para ser bioacumulado y biomagnificado a través de la cadena trófica acuática y terrestre, a niveles que podrían resultar en efectos adversos para la salud humana y animal y d) sus potenciales efectos tóxicos tales como los inmunotóxicos, neurotóxicos, desarrollo de toxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad y disrupciones endócrinas [3].

### 1.1.1 CONVENIO DE ESTOCOLMO

En 2001 el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes elaboró la primer lista de POP cuyas emisiones y o producción debían ser eliminados, o al menos, notablemente reducidos. Esa lista incluye una variedad de POP: pesticidas organoclorados u OCP (del inglés *organochlorine pesticides*) tales como DDT (dicloro difenil tricloroetano), Aldrin, Clordano, Dieldrin, Endrin, heptacloro, hexaclorobenceno (HCB), mirex y toxafeno; como también los bifenilos policlorados o PCB (del inglés *polychlorinated biphenyls*) y dibenzo-p-dioxinas policloradas y dibenzofuranos (PCDD/F), comúnmente llamados “dioxinas” [1].

Sin embargo, es una lista dinámica y, por lo tanto, muchos compuestos con similares propiedades han sido agregados a través del tiempo dado nuevos estudios sobre la ecotoxicidad de los mismos. En mayo de 2009, una nueva lista de químicos fue incluida, incluyendo otros pesticidas tales como clordecona,  $\alpha$ -hexaclorociclohexano ( $\alpha$ -HCH),  $\beta$ -hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH), lindano, pentaclorobenceno; bifenilos polibromados como el hexabromobifenilo; éteres de difenilo polibromados, (tetra-, penta-, hexa- y hepta-BDE) como así también sustancias alquilperfluoradas (ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS) y sus sales) y fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF). Luego se agregó al endosulfán y al hexabromociclodecano o HBCD (del inglés *hexabromocyclodecane*) en la primera y sexta conferencia de las partes en

2011 y 2013, respectivamente [1]. En la **tabla 1** se listan de manera resumida los principales POP actualmente incluidos al Convenio de Estocolmo.

*Tabla 1. Listado de las enmiendas del Convenio de Estocolmo sobre POP*

<b>Ítem</b>	<b>Químico</b>	<b>n° CAS</b>	<b>Tipo</b>	<b>Isómeros y homólogos</b>
<b>Enmienda del 2001</b>				
1	Aldrin	309-00-2	Pesticida	Aldrin e Isoaldrin
2	Dieldrin	60-57-1	Pesticida	-
3	Endrin	72-20-8	Pesticida	-
4	Clordano	57-74-9	Pesticida	$\alpha$ - y $\beta$ -isómeros
5	Heptacloro	76-44-8	Pesticida	-
6	HCB	118-74-1	industrial y pesticida	-
7	Mirex	2385-85-5	Pesticida	-
8	Toxafeno	8001-35-2	Pesticida	Cientos de isómeros
9	DDT	50-29-3	Pesticida	p,p'-DDT; o,p'-DDT; p,p'- DDE; p,p'-DDD
10	PCB	-	industrial y subproducto	209 congéneres
11 y 12	PCDD y PCDF	-	subproducto	75 congéneres de PCDD y 135 congéneres de PCDF
<b>Enmienda del 2009</b>				
13	Clordecono	143-50-0	pesticida	-
14	Lindano	58-89-9	Pesticida	-
15	( $\gamma$ -HCH) $\alpha$ -HCH	319-84-6	Pesticida y subproducto	-
16	$\beta$ -HCH	319-85-7	Pesticida y subproducto	-
17	Hexabromobifenilo	36355-01-8	industrial	42 congéneres
18	tetra y penta-BDE	-	industrial	Co-existen en los penta- BDE comerciales
19	hexa y hepta-BDE	-	industrial	Co-existen en los octa-BDE comerciales
20	PFOS y sus sales	1763-23-1	industrial	isómeros de cadena lateral

21	pentaclorobenceno	608-93-5	pesticida, industrial y subproducto	-
<b>Enmienda del 2011</b>				
22	Endosulfán	115-29-7	pesticida	α- y β-isómeros
<b>Enmienda del 2015</b>				
23	naftalenos clorados	-	industrial	-
24	hexaclorobutadieno	87-68-3	industrial	-
25	pentacloro fenol	87-86-5	industrial	-
<b>Enmienda del 2017</b>				
26	deca-BDE	-	industrial	Co-existen en los deca-BDE comerciales
27	Parafinas cloradas de cadena corta	-	industrial	-

### **1.1.2 APLICACIÓN DEL CONVENIO DE ESTOCOLMO SOBRE POP EN LA REPÚBLICA ARGENTINA**

La ley N° 25.278 aprueba el Convenio de Róterdam sobre el Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo aplicable a ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos objeto de Comercio Internacional. El Convenio fue ratificado por Argentina el 11 de junio de 2004, por lo que el país es Parte desde septiembre de 2004.

La ley N° 26.011 aprobatoria del convenio de Estocolmo entró en vigor el 17 de mayo de 2004. Argentina lo ratificó el 25 de enero de 2005 y se convirtió en Parte el 25 de abril de ese mismo año. En el 2007 Argentina presentó su primer Plan Nacional de Aplicación (PNA) realizado por la entonces Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS) en colaboración con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y financiado por el Fondo para el Medio Ambiente Mundial (FMAM) [4].

La ley N° 25.670 de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental en Argentina entró en vigor en el año 2002. En lo relacionado con cada contaminante, 13 de los plaguicidas incluidos en el Convenio de Estocolmo han sido regulados en diferentes normativas. El decreto N° 5.769 del 12 de mayo de 1959 crea el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal administrada en la actualidad por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). En el año 2014 se inició el procedimiento de actualización del PNA actualizando los inventarios nacionales

de POP y desarrollando nuevos lineamientos de acción que incluyan a los nuevos químicos listados.

La siguiente lista cuenta con las sustancias incluidas en el Convenio de Estocolmo que hasta noviembre del 2017 no cuentan con restricciones formales en Argentina:

- Éter de tetrabromo difenilo y éter de penta-bromo difenilo y otros éteres presentes en la mezcla comercial que los contiene (tetra-BDE y penta-BDE),
- Pentacloro benceno,
- Éter de hexabromo difenilo y éter de hepta-bromo difenilo (hexa-BDE y hepta-BDE),
- Hexa.bromo difenilo,
- Hexacloro butadieno,
- Naftalenos policromados,
- Éter de decabromo difenilo (deca-BDE),
- Parafinas cloradas de cadena corta,
- Ácido perfluoro-octano sulfónico, sus sales y el fluoruro de perfluoro-octano sulfonilo.

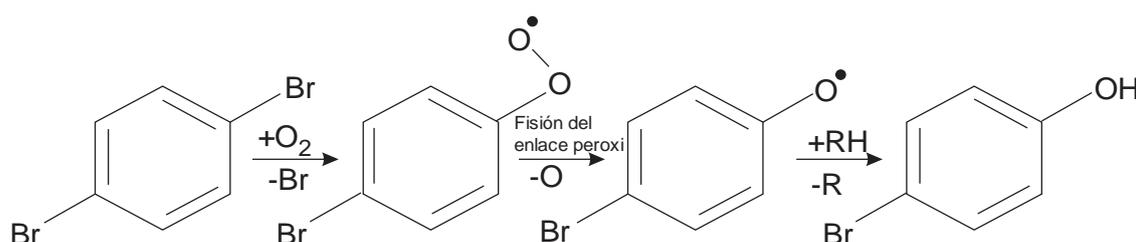
Cabe señalar que Argentina ha ratificado las enmiendas realizadas durante el 2015 y el 2017. Las enmiendas más recientes se encuentran en proceso de evaluación para posterior ratificación [4].

### **1.1.3 ÉTERES DE DIFENILO POLIBROMADOS**

Los éteres de difenilo polibromados o PBDE (del inglés *polybrominated diphenyl ethers*) son una clase de compuestos químicos que pertenecen al grupo de los retardantes de llama bromados o BFR (*brominated flame retardants*) considerados como POP. Los PBDE han sido usados extensamente durante los 70's en muchos tipos de polímeros usados en circuitos electrónicos, computadoras, televisores, muebles, materiales de construcción, textiles, pisos y vehículos, entre otros [5]. Estos compuestos son aditivos que se mezclan con los polímeros, es decir, no están unidos químicamente a la masa polimérica [6].

Su principal función es reducir la inflamabilidad de los polímeros [7]. Para comprender el modo de acción de los retardantes de llama, es esencial introducir una pequeña reseña del proceso de combustión. La combustión es una reacción en fase gaseosa que involucra una fuente de combustible y oxígeno [8]. Los 4 pasos involucrados en el proceso de combustión son precalentamiento, volatilización/descomposición, combustión y propagación [8]. Uno de los modos de acción de los BFR es capturar radicales libres (agentes altamente oxidantes y reactivos) durante el proceso de combustión, los cuales son elementos esenciales para que la llama se propague. Los halógenos en los BFR son muy efectivos para capturar radicales libres

y, por lo tanto, eliminan la capacidad de propagación de la llama en los productos en los que han sido agregados como aditivos. Los 4 compuestos halógenos son efectivos para eliminar los radicales libres y la eficiencia de captura dependerá de: a) la cantidad de átomos que contenga la molécula y b) la facilidad que presente la molécula para liberarlos o lo que es lo mismo, la energía de disociación heterolítica del enlace carbono-halógeno. Por lo tanto, la eficiencia de captura de radicales libres aumenta con el tamaño del compuesto halógeno (es decir,  $I > Br > Cl > F$ ) [9]. En la **figura 1** se observa un mecanismo de acción química de los retardantes de llama bromados.



*Figura 1. Mecanismo de acción químico por captura de radicales de los retardantes de llama bromados.*

Por lo tanto, los PBDE tienen una eficiencia de captura más alta que los compuestos con cloro e iodo [9]. Dependiendo de la posición y el número de bromos que contienen los PBDE, estos se nombran con un sistema de nomenclatura específico, obteniendo 209 congéneres [10].

Las mezclas comerciales de PBDE también se basan en la estructura molecular del compuesto y se los clasifica como –penta-, –octa- y –deca- mezclas. La mezcla comercial penta-BDE contiene predominantemente a los congéneres BDE-47, -99, -100, -153 y -154, los más comunes encontrados en el ambiente. Estos congéneres se utilizan principalmente en espumas de poliuretano y en textiles. La mezcla octa-BDE que contiene principalmente a los BDE-183 y -153, se agregan normalmente a estirenos, policarbonatos y termoestables [10]. Y por último la mezcla deca-BDE que contiene principalmente al BDE-209. El BDE-209 es el BDE más bromado, conteniendo 10 bromos en su molécula y el que tiene la base de datos toxicológica más extensa [11]. El BDE-209 se utiliza en plásticos ABS (*acrylonitrile butadiene styrene*), poliestireno de alto impacto, resinas epoxi y caucho y, por lo tanto, puede aparecer en aparatos y productos electrónicos [12].

Las propiedades fisicoquímicas de los PBDE están íntimamente relacionadas con el número y posición de los bromos en la molécula. Las propiedades tales como la solubilidad en agua o el coeficiente de partición ( $K_{OA}$ ) son muy importantes para comprender la distribución de los PBDE en el ambiente. En la **Tabla 2** se observan las principales características y propiedades fisicoquímicas de los PBDE más comúnmente encontrados en el ambiente [7]. Como se puede

observar, los valores de  $K_{OA}$  para BDE-47, -100, -99 y -153 aumenta a medida que aumenta el número de bromos y varía su posición. Los valores presentados se encuentran entre 6,8 y 10 lo que implicaría que estos compuestos tienen afinidad con las matrices ricas en lípidos [13].

### *BIODISPONIBILIDAD, BIOACUMULACIÓN Y TOXICIDAD DE LOS PBDE*

La biodisponibilidad y la bioacumulación están intrínsecamente conectadas entre sí y directamente relacionadas a la interacción de las sustancias químicas con el ambiente biótico y abiótico. La biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos en el ambiente depende de varios factores que incluyen la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, sus principales fuentes de producción, su capacidad para ser transportados a diferentes ambientes y la naturaleza del medio en el cual estos compuestos se encuentran [7].

Debido a que los PBDE cumplen un rol como aditivos poliméricos, éstos pueden ser liberados al ambiente durante su tiempo de uso, así como después de la eliminación final de los productos, incluyendo la lixiviación de pilas de acopio, los desechos industriales o las fugas accidentales. Una vez en el ambiente, pueden ser transportados a través de la atmósfera o corrientes de agua, depositados por flujos húmedos o secos y pueden acumularse en los ecosistemas alejados de sus sitios de producción y uso. Como consecuencia, los PBDE se detectan en muestras ambientales que incluyen, material particulado, sedimentos, lodos y efluentes [14]. Una gran variedad de PBDE podrían acumularse en los sedimentos debido a sus propiedades hidrófobas, y magnificarse en el medio ambiente acuático [15] a través de la cadena trófica. Como consecuencia de la persistencia, bioacumulación y biomagnificación de los PBDE a través de la cadena trófica, la detección y el aumento de los niveles de concentración de PBDE en tejidos humanos (por ejemplo: sangre, suero, leche materna, etc.) ha cobrado preocupación mundial debido a su tendencia potencial a alterar las hormonas tiroideas, provocar déficit neuroconductual y efectos endocrinos negativos en los mamíferos de laboratorio [16].

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los PBDE frecuentemente encontrados en el ambiente

Nombre común – N° CAS	Nombre químico	Estructura química	log $K_{OA}$ [17]	Punto de ebullición [°C] [13]	Temperatura de descomposición [°C] [7]	Presión de vapor [Pa, 25°C] [13]	Solubilidad en agua [ $\mu\text{g L}^{-1}$ , 25°C] [13]	Vida media [7]
<b>BDE-47</b> 5436-43-1	Éter 2,2',4,4'-tetrabromo difenilo		6,81	200-300	-	$2,5 \cdot 10^{-4}$	13,3	1,8 años
<b>BDE-100</b> 189084-64-8	Éter 2,2',4,4',5'-pentabromo difenilo		7,32	416	>200	$5,0 \cdot 10^{-5}$	2,4	1,6 años
<b>BDE-99</b> 60348-60-9	Éter 2,2',4,4',6'-pentabromo difenilo		7,66	434	>200	$2,1 \cdot 10^{-7}$	40	2,9 años
<b>BDE-153</b> 68631-49-2	Éter 2,2',4,4',5,5'-hexabromo difenilo		8,55	453	-	$5,8 \cdot 10^{-6}$	0,9	6,5 años
<b>BDE-209</b> 1163-19-5	Éter 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromo difenilo		9,98	-	>320	$4,6 \cdot 10^{-6}$	>1	15 días

Desde el punto de vista toxicológico, los PBDE son similares estructuralmente a la hormona tiroidea tiroxina (T4) y, por lo tanto, alteran la homeostasis de las hormonas tiroideas y la síntesis del estradiol y así causan neurotoxicidad [18]. Actualmente, se están llevando a cabo diferentes estudios considerando a los PBDE como posibles factores de riesgo del autismo [7,19–21], así como algunos otros, que investigan la posibilidad de que los PBDE se transfieran a través de la placenta y la leche materna de la madre al bebé [19,22]. La exposición a los PBDE en la etapa prenatal e infantil se ha asociado con disminuciones en la función cognitiva, deficiencias en la función ejecutora, aumento del comportamiento y de los síntomas relacionados con el trastorno por déficit de atención/hiperactividad y menor coordinación motora en niños [23]. El mecanismo por el cual los PBDE ejercen sus efectos neurotóxicos no está claro, pero los mecanismos sospechosos incluyen alteración de los sistemas colinérgicos, estrés oxidativo, inducción de la apoptosis celular, afectación en la metilación del ADN y proteínas neuronales [23].

#### OCURRENCIA DE LOS PBDE EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO

Los suelos cumplen un rol importante en la distribución global de los PBDE. Una vez depositados, estos químicos tienden a acumularse en el suelo por cierto periodo de tiempo. Los procesos de intercambio de PBDE entre el suelo y el aire afectan significativamente el destino y el transporte de los PBDE en el ambiente [24]. Además, se ha demostrado que el suelo influye en la distribución y la biogeoquímica de los PBDE en el ambiente. Los distintos usos de la tierra (rural, urbano e industrial) conducen a la contaminación de los ambientes acuáticos por los PBDE principalmente a través de la escorrentía, las descargas directas y la deposición húmeda/seca [25]. Los PBDE de la columna de agua pueden acumularse fácilmente en la biota y transferirse a los humanos a través del consumo de esos organismos. En la **tabla 3** se resumen algunos estudios sobre la ocurrencia de PBDE en matrices bióticas y abióticas.

*Tabla 3. Ocurrencia de los PBDE en el ambiente biótico y abiótico*

Congéneres	Matriz	mín-máx	Área de estudio	Ref
$\sum_6 PBDE$	sedimentos	nd <sup>1</sup> -0,65 ng g <sup>-1</sup> (p.s.) <sup>2</sup>	Bahía San Blas, Argentina	[26]

<sup>1</sup> nd: No detectado

<sup>2</sup> (p.s.): peso seco

$\sum_7$	PBDE	sedimentos	0,63-0,67 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Lago Taihu, China	[27]
$\sum_{10}$	PBDE	sedimentos	0,16-2,02 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Estuario de Bahía Blanca, Argentina	[28]
		suelos	0,04-10,7 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)		
$\sum_{10}$	PBDE	Aguas residuales	0,57-117 ng g <sup>-1</sup> (p.l.) <sup>3</sup>	Ontario, Canadá	[29]
$\sum_{14}$	PBDE	Aire	1,6*10 <sup>3</sup> g año <sup>-1</sup>	Mendoza, Argentina	[30]
$\sum_{21}$	PBDE	Aire	0,69-2,58 pg m <sup>-3</sup>	Océano Atlántico Sur	[31]
$\sum_{10}$	PBDE	Suelo	0,94-55,1 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Michigan, Estados Unidos	[32]
$\sum_9$	PBDE	Suelo	0,88-765 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Norte de Canadá	[33]
$\sum_9$	PBDE	Polvo	14-26*10 <sup>3</sup> ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Sur de Nigeria	[34]
$\sum_{12}$	PBDE	Aire	0,21-2,90 pg m <sup>-3</sup>	Oeste Antártico	[35]
$\sum_9$	PBDE	Partículas finas atmosféricas	0,05-19,1 pg m <sup>-3</sup>	Beijing, China	[36]

<sup>3</sup> (p.l.): peso en lípidos

$\sum_{26}$	PBDE	Lodos residuales	300-655 ng g <sup>-1</sup> (p.s.) (urbano) 67-2,5*10 <sup>7</sup> ng g <sup>-1</sup> (p.s.) (industrial)	Turquía	[37]
$\sum_{12}$	PBDE	Sedimentos	nd-29 µg kg <sup>-1</sup> (p.s.)	Río Tames, Londres	[38]
$\sum_{10}$	PBDE	Sedimentos	4*10 <sup>-3</sup> -1,8 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Rusia	[39]
$\sum_7$	PBDE	Sedimentos	20-78 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)	Río Vaal, Sudáfrica	[40]
$\sum_{19}$	PBDE	Leche materna	22,7-1*10 <sup>6</sup> pg g <sup>-1</sup> (p.l.)	Catalunia, España	[41]
$\sum_4$	PBDE	Sangre humana	0,64-0,76 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Letonia	[2]
$\sum_9$	PBDE	Peces de río	22-870 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Río Negro, Argentina	[42]
$\sum_{14}$	PBDE	Grasa de ballena	nd-33,4 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	En el sur del océano Pacífico	[43]
$\sum_7$	PBDE	Leche humana	0,57-117 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Asia	[22]
			0,07-6,3 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Europa	
			2,99-54,5 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Norte de América	
		Cordón umbilical	0,65-89 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Asia	
			0,96-17 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Europa	
			38,4-100 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Norte de América	
Placenta	0,32-32,3 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Asia			
	nd-2,31 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Europa			

			nd-17,6 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Norte de América	
$\sum_{37}$	<i>PBDE</i>	Alimento de origen animal	3,22-13,7 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Beijing, China	[44]
$\sum_7$	<i>PBDE</i>	Moluscos	22,5-355 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)	Mar Bohai, China	[45]
$\sum_7$	<i>PBDE</i>	cabello humano	13-2220 ng g <sup>-1</sup>	Indiana, EE.UU.	[16]
$\sum_5$	<i>PBDE</i>	cabello humano	3,2-19,9 ng g <sup>-1</sup>	Madrid, España	[46]

1.2 CO

NT

AMI

NA

NT

ES

EM

ER

GE

NT

ES

Los contaminantes emergentes o EC (del inglés *emerging contaminants*) son aquellas sustancias que actualmente no están incluidas en los programas de monitoreo de rutina. Los EC son posibles candidatos para una futura regulación dependiendo de la investigación sobre su ecotoxicidad y datos de monitoreo con respecto a su ocurrencia en el ambiente [47]. En algunos casos, también son sustancias que aún requieren el desarrollo de modelos conceptuales para describir su comportamiento y ocurrencia en el medio ambiente.

A diferencia de los POP, los EC tienden a tener una mayor polaridad y son más biodegradables. Además, los EC no son persistentes en el ambiente y su constante uso y liberación al ambiente les permite mantener su presencia y, por este motivo, se les suele llamar “pseudo-persistentes”. Estas propiedades fisicoquímicas han llevado a los investigadores a considerar que el potencial para el transporte atmosférico es insignificante. A pesar de esto, se han encontrado EC en regiones aisladas de su uso y producción, como en el ártico [48] o zonas de alta montaña [49,50]. Los EC incluye a los productos farmacéuticos y de cuidado personal o

PPCP (del inglés *pharmaceutical and personal care products*) [51], drogas ilícitas [52], hormonas y esteroides [53], pesticidas de uso corriente o CUP (del inglés *current-use pesticides*), retardantes de llama fosforados o PFR (del inglés, *phosphate flame retardants*) y plastificantes [54] y microplásticos [55], entre otros.

### **1.2.1 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS**

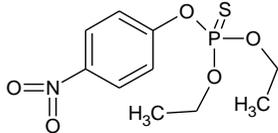
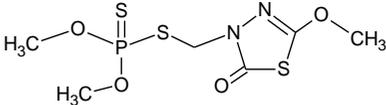
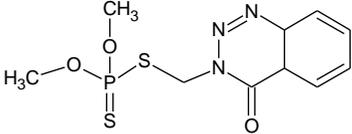
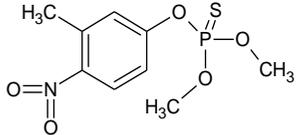
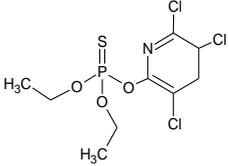
Los pesticidas organofosforados u OP (por sus siglas en inglés, *organophosphorus pesticides*) son compuestos denominados CUP, un sub grupo de los EC. Estos pesticidas son, generalmente, menos persistentes que los OCP en el medio ambiente y no se espera que se sometan a un transporte de largo alcance, aunque hasta el 90% de algunos pesticidas usados actualmente pueden volatilizarse dentro de algunos días posteriores a su aplicación, dependiendo de las condiciones locales [56].

Los OP han sido ampliamente usados como insecticidas en agricultura. Son muy efectivos frente a una gran variedad de insectos y han jugado un importante rol en el incremento de la productividad agrícola [57]. Su síntesis comenzó cuando se prohibieron los OCP tales como el DDT y el dieldrin, entre otros, en los 70 [58]. Los OP son los pesticidas de uso más extenso alrededor del mundo representando aproximadamente el 34% [59] del total de pesticidas. Los OP contemplan 48 compuestos ampliamente utilizados [60]. Entre ellos se encuentra el clorpirifos (CPF), fenitrotión (FE), metidation (MTD), gutión (GU) y paratión (PA) ampliamente utilizados en la provincia de Mendoza, Argentina los cuales se encuentran detalladas sus propiedades fisicoquímicas en la **tabla 4**.

#### **BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD DE LOS OP**

La biodisponibilidad de los OP en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con las sustancias químicas (temperatura ambiental, tipo de plaguicida, intensidad, etc.), como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, estilo de vida, etc).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de los OP frecuentemente usados en Mendoza, Argentina.

Nombre común – N° CAS	Nombre químico	Estructura química	$K_{OA}$	Punto de ebullición [°C]	Temperatura de descomposición [°C]	Punto de inflamación [°C]	Solubilidad en agua a 20-25°C [g L <sup>-1</sup> ]	Persistencia en el agua [días]
<b>Paratión</b> 56-38-2	Fosforotioato de O,O-dietil-O-(4-nitrofenilo)		3,8	375	200	120	1,1.10 <sup>-2</sup>	100-200
<b>Metidatión</b> 950-37-8	Fosforoditioato de O,O-dimetil-S-(5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-il) de metilo		0,8	100	No se descompone	No es inflamable	0,24	30-60
<b>Gutión</b> 86-50-0	Fosforoditioato de O,O-dimetil-S-(4-oxo-4 <sup>a</sup> ,8 <sup>a</sup> -dihidro-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il) de metilo		2,9	200	200	No es inflamable	2,8.10 <sup>-2</sup>	5-23
<b>Fenitrotión</b> 122-14-5	Fosforotioato de O,O-dimetilo-O-(3-metil-4-nitrofenilo)		3,4	118	315	157	2,1.10 <sup>-2</sup>	Hasta 30
<b>Clorpirifos</b> 2921-88-2	Fosforotioato de O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-4,5-dihidropiridin-2-il)		4,7	143	160-200	84,4	1,4.10 <sup>-3</sup>	5-18

En el ecosistema acuático, hay un intercambio continuo de pesticidas entre la tierra, los sedimentos, la interface sedimento-agua, las aguas intersticiales, los organismos acuáticos y la interface aire-agua. La distribución de un compuesto entre agua, materiales bióticos y abióticos pueden afectar su dinámica en el ecosistema [61]. La absorción en los sedimentos es probablemente el sumidero más importante para pesticidas y otros contaminantes ambientales influenciado por diversos factores como el contenido orgánico y el tipo de sedimento, las propiedades fisicoquímicas del pesticida, es decir, la presión de vapor, la solubilidad en agua y el coeficiente de partición octanol-agua, entre otros [62]. La adsorción de los compuestos lipofílicos por los sedimentos juega un papel importante en la absorción de pesticidas por parte de los organismos acuáticos, y esto explica en gran medida por qué la toxicidad de los pesticidas para la vida silvestre es predominantemente una problemática acuática en comparación con los ecosistemas terrestres [63].

La toxicidad de los OP está dada por la disrupción del sistema nervioso de un invertebrado o vertebrado por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa o AChE (por *acetylcholinesterase*). Los OP pueden ser letales porque inhiben a la AChE haciendo que se acumule acetilcolina en las sinapsis colinérgicas. Este aumento de la acetilcolina despolariza a la célula postsináptica y la torna refractaria a la liberación ulterior de acetilcolina, provocando parálisis neuromuscular y otros efectos [64].

#### *OCURRENCIA DE LOS OP EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO*

El uso generalizado de pesticidas en áreas agrícolas y urbanas puede causar que los pesticidas ingresen por vías difusas de fenómenos tales como escorrentía superficial, erosión, rocío y lixiviación [65]. La aparición de diversos pesticidas en ambientes acuáticos puede representar una posible preocupación ambiental. Asimismo, las verduras son el vínculo de los pesticidas entre el suelo, aire y los humanos. De este modo, los OP ingresan a la cadena trófica a través de la irrigación de cultivos. Los cultivos absorben una gran variedad de contaminantes presentes en el suelo o en el agua de riego [66]. Por otro lado, la exposición a los pesticidas ocurre con mayor frecuencia en entornos ocupacionales, en los que los fabricantes, los que aplican los pesticidas o los que cosechan productos agrícolas tratados están expuestos. En la **tabla 5** se detallan algunas concentraciones encontradas en el ambiente biótico y abiótico.

*Tabla 5. Ocurrencia de los OP en el ambiente biótico y abiótico.*

OP	Matriz	mín-máx	Área de estudio	Ref
$\sum_6$ OP	lechuga, coliflor, brócoli, repollo, espinaca, apio y mostaza  suelo	nd-200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (p.s.)  nd-26,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (p.s.)	Cameron Highlands, Malasia	[67]
$\sum_4$ OP	plantas medicinales <sup>4</sup>	nd-98,2 $\text{ng g}^{-1}$ (p.s.)	Mercados de Irán	[68]
$\sum_7$ OP	leche de cabra  alimento de ganado  agua para consumo	$6 \cdot 10^{-3}$ - $4,8 \cdot 10^{-2}$ $\text{mg kg}^{-1}$ (p.s.) 0,01-0,14 $\text{mg kg}^{-1}$ (p.s.) 0,08-0,039 $\text{mg L}^{-1}$	Heliongjiang, China	[69]
$\sum_6$ OP	agua de río	6,51-17,5 $\text{ng L}^{-1}$	Canal Sur, China	[70]
$\sum_{18}$ OP	Tejido humano (hígado y riñón)	0,01-4,6 $\text{ng g}^{-1}$ (p.s.)	Roma, Italia	[71]
$\sum_3$ OP	Queso y leche de oveja	0,8-2 $\text{ng g}^{-1}$ (p.l.)	Grecia	[72]
$\sum_4$ OP	agua de cuenca  suelos  suelos subterráneos	$1,7 \cdot 10^3$ - $2,2 \cdot 10^3$ $\mu\text{g L}^{-1}$ 0,54-5,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (p.s.) 0,4-5,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (p.s.)	Cuenca Yangzte, China	[73]
$\sum_4$ OP	Miel	nd-2,3 $\text{ng g}^{-1}$ p.s.	Mendoza, Argentina	[74]

<sup>4</sup> *Zataria multiflora*, *Matricaria chamomile*, *Borago officinalis*, *Mentha spicata* y *Cuminum cyminum*.

## 1.2.2 RETARDANTES DE LLAMA FOSFORADOS

Los PFR son una clase de contaminantes emergentes. Debido a la toxicidad y persistencia de los PBDE, se han comenzado a utilizar retardantes de llama alternativos [75], entre ellos los PFR. Los PFR poseen una estructura molecular que consta de un grupo funcional principal (grupo fosfato) y los radicales unidos pueden variar desde metilos a grupos fenilo. Los PFR pueden clasificarse en orgánicos e inorgánicos con estructuras similares a los pesticidas organofosforados. Considerando sólo los orgánicos, se pueden reconocer 3 grupos importantes: los fosfatos, los fosfonatos y los fosfinatos. El tercer grupo es el perteneciente a los PFR halogenados [76]. Existe una gran variedad de estos compuestos, los cuales a su vez cumplen funciones diferentes y específicas. Los PFR no halogenados son usados predominantemente como plastificantes y lubricantes en los polímeros utilizados para el empaquetado de alimentos, en cera para pisos y fluidos hidráulicos [77]. A su vez, los PFR halogenados son utilizados en lacas, pinturas, pegamentos, entre otros [78]. Los PFR más utilizados son: tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP), tris(1-cloro-2-propil) fosfato (TCPP), tris(1,3-dicloro-iso-propil) fosfato (TDCIPP) y los PFR no halogenados tales como tri-n-butil fosfato (TnBP), tri-fenil fosfato (TPhP), tris(2- etilhexil) fosfato (TEHP), tris(2-butoxietil) fosfato (TBEP) y el tri-cresil (o toliil) fosfato (TCP).

No se puede describir un solo modo de acción de estos retardantes ya que los PFR halogenados actúan en la fase gaseosa y los PFR no halogenados actúan en la fase sólida de los materiales que se incineran [76]. Cuando los fosfatos de los PFR se calientan, reaccionan y forman una forma polimérica de ácido fosfórico [76]. Este ácido provoca una capa de carbón que protege al material del oxígeno, evitando así la formación de gases inflamables [76]. Otro mecanismo de acción de los PFR es similar a los retardantes de llama que contienen bromo o cloro [76], capturando radicales libres.

Existe una gran variación en las propiedades fisicoquímicas de los PFR. Por ejemplo, hay algunos PFR que son sumamente solubles en agua, mientras que otros son totalmente inmiscibles en agua. Por otra parte, la solubilidad de los PFR disminuye mientras aumenta la masa molecular del compuesto. En caso de que su vida media de hidrólisis sea igual, es más probable que se encuentren en el ambiente acuático los PFR con masas moleculares más bajas que aquellos con masa molecular alta, lo cual se condice con sus valores de  $\log K_{OA}$ . Los PFR presentan un amplio rango de valores de  $\log K_{OA}$  entre 1,4 y 6,4. En relación con los BFR los cuales oscilan entre 4,3 y 9,9; los PFR son más hidrófobos [76]. En la **tabla 6** se presentan las propiedades fisicoquímicas de algunos PFR (los más reportados alrededor del mundo) y en el anexo 2, sección 6.1.1., sus estructuras químicas.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los PFR [76].

Nombre común – N° CAS	Nombre Químico	Punto de ebullición [°C]	Punto de fusión [°C]	Solubilidad en agua [mg L <sup>-1</sup> ] a 25°C	Presión de vapor [mmHg] a 25 °C	Log K <sub>OA</sub>
<b>TPhP/TPP</b> 115-86-6	Trifenil fosfato	370	49	1,9	1,2x10 <sup>-6</sup>	4,59
<b>TEHP</b> 78-42-2	Tris(2-etilhexil) fosfato	220	87	0,6	2,0 x10 <sup>-6</sup>	4,22
<b>TCIPP/TCPP</b> 1067-98-7	Tris(3-cloro-isopropil) fosfato	342	-40	1,6 x10 <sup>3</sup>	1,9 x10 <sup>-6</sup>	2,59
<b>TCEP/TCIEP</b> 115-96-8	Tris(2-cloro-etil) fosfato	351	-55	7 x10 <sup>3</sup>	1,1 x10 <sup>-4</sup>	1,44
<b>TBOEP/TBEP</b> 78-51-3	Tris(2-butoxi-etil) fosfato	414	-70	1,2 x10 <sup>3</sup>	2,1 x10 <sup>-7</sup>	3,65
<b>TDCIPP/ TDCPP</b> 13674-87-8	Tris(1,3-dicloro-2- propil) fosfato	457	88	1,5	7,4 x10 <sup>-8</sup>	3,8
<b>TnBP/TBP/ TBPA</b> 126-73-8	Tributil fosfato	289	-80	280	1,1 x10 <sup>-3</sup>	4
<b>TPRP/TPrP</b> 513-08-6	Tripropil fosfato	254	27	827	2,9 x10 <sup>-2</sup>	2,67
<b>EHDPP/EHDPhP</b> 1241-94-7	2-etilhexil difenil fosfato	421	-30	1,9	6,5 x10 <sup>-7</sup>	5,73
<b>TMTP/m-TCP</b> 563-04-2	Tri-m-tolil fosfato	442	90	1,84 x10 <sup>-2</sup>	1,4 x10 <sup>-7</sup>	6,34
<b>TOTP/o-TCP</b> 1330-78-5	Tri-o-tolil fosfato	410	11	1,84 x10 <sup>-2</sup>	1,8 x10 <sup>-7</sup>	5,48
<b>TPTP/p-TCP</b> 78-32-0	Tri-p-tolil fosfato	439	77	7,4 x10 <sup>-2</sup>	1,8 x10 <sup>-7</sup>	5,48
<b>2IPDPP</b> 28108-99-8	2-isopropilfenil difenil fosfato	424	89	2,2	5,2 x10 <sup>-7</sup>	5,31

<b>4IPDPP</b> 55864-04-5	4-isopropilfenil difenil fosfato	ND <sup>5</sup>	ND	ND	ND	ND
<b>T2IPPP</b> 64532-95-2	Tris(2-isopropilfenil) fosfato	ND	ND	ND	ND	ND
<b>T35DMPP</b> 25155-23-1	Tris(3,5-dimetilfenil) fosfato	491	90	1,86 x10 <sup>-2</sup>	5,2 x10 <sup>-8</sup>	5,63
<b>B4IPPPP</b> 115-87-7	Bis(4-ter-butilfenil) fenil fosfato	ND	ND	ND	ND	ND

---

<sup>5</sup> ND: no disponible

## BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD DE LOS PFR

La biodisponibilidad de los PFR en el medio ambiente puede deberse a actividades urbanas como a la liberación en ambientes interiores (alfombras, pinturas, entre otros productos hogareños que contienen PFR) que representan fuentes no puntuales de PFR. Los PFR al igual que los PBDE, no están unidos químicamente a los materiales, por lo que se liberan fácilmente al ambiente por volatilización, abrasión y disolución [79]. En consecuencia, la transferencia de partículas de aire con PFR al cabello y las uñas humanas se dedujeron de estudios de monitoreo de PFR [80]. Estos estudios sugieren el potencial transporte atmosférico de los PFR.

La mayoría de los PFR no halogenados muestran fuertes efectos hemolíticos (descomposición de los glóbulos rojos) y se sospecha que algunos sean potencialmente carcinogénicos [76]. Se han observado efectos neurotóxicos para TCEP, TnBP y TPhP. A su vez, se ha documentado que TPhP puede producir efectos alergénicos y efectos adversos sobre la fertilidad, mientras que, TDCPP ha sido asociado con alteración en los niveles de hormonas y disminución en la calidad del semen en machos [81]. Algunos también muestran propiedades de disrupción endócrina alterando las concentraciones de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triiodotironina (T3) en peces cebra [75]. Estudios epidemiológicos preliminares han mostrado asociaciones entre la exposición a los PFR y los resultados de salud que incluyen asma y alergia, salud reproductiva masculina y función tiroidea [82–85].

## OCURRENCIA DE LOS PFR Y SUS METABOLITOS EN EL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO

Dado el amplio uso de los PFR, estos son constantemente liberados al ambiente y por tal motivo han sido detectados en distintos compartimentos ambientales. La aparición de los PFR en el medio acuático es una de las principales preocupaciones debido a sus posibles efectos tóxicos y perjudiciales sobre la biota. Muchos estudios han detectado PFR en agua, sedimentos y peces en el todo el mundo [86]. De este modo, la biota y, en particular, los humanos se encuentran en constante exposición a estos contaminantes por diferentes vías. La **tabla 7** resume la ocurrencia de los PFR y sus metabolitos en muestras bióticas y abióticas. Como se puede observar en la tabla, no hay reportes de PFR y sus metabolitos en Argentina.

*Tabla 7. Ocurrencia de los PFR y sus metabolitos en el ambiente biótico y abiótico.*

PFR	Matriz	mín-máx	Área de estudio	Ref
-----	--------	---------	-----------------	-----

			0,8-30 ng mL <sup>-1</sup> pers <sup>-1</sup>	Amberes, Bélgica	
$\sum_6$	<i>metabolitos de PI</i>	orina humana	1,6-29,1 ng mL <sup>-1</sup> pers <sup>-1</sup>	Atenas, Grecia	[87]
			nd-9,2 ng mL <sup>-1</sup> pers <sup>-1</sup>	Bruselas, Bélgica	
			1,1-27,0 ng mL <sup>-1</sup> pers <sup>-1</sup>	Ginebra, Suiza	
			0,5-30,2 ng mL <sup>-1</sup> pers <sup>-1</sup>	Vilna, Lituania	
$\sum_7$	<i>PFR</i>	Cabello humano	nd-3,7*10 <sup>4</sup> ng g <sup>-1</sup>	Noruega	[88]
$\sum_{13}$	<i>PFR</i>	Agua	170-5,1*10 <sup>3</sup> ng L <sup>-1</sup>	Bahía de San Francisco, EE.UU.	[89]
		Sedimento	9,5-33 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)		
		molusco (bivalvo)	8,7-25 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)		
		grasa de foca	17-67 ng g <sup>-1</sup> (p.l.)		
$\sum_{11}$	<i>PFR</i>	polvo hogareño	nd-1,9*10 <sup>3</sup> µg g <sup>-1</sup>	Amberes, Bélgica	[85]
$\sum_{14}$	<i>metabolitos de PI</i>	orina humana	nd-13 ng mL <sup>-1</sup>		
$\sum_6$	<i>PFR</i>	Agua superficial	311-2,1*10 <sup>3</sup> ng L <sup>-1</sup>	Delta del Río Perla, China	[86]
		Material particulado	17,1-367 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)		
		Sedimentos	16,8-132 ng g <sup>-1</sup> (p.s.)		
$\sum_{37}$	<i>PFR</i>	Aire hogareño	nd-9,66 ng m <sup>-3</sup>	Oslo, Noruega	[90]
		Polvo hogareño	42,7-8,9*10 <sup>4</sup> ng g <sup>-1</sup>		
$\sum_{10}$	<i>PFR</i>	Agua de consumo humano	nd-1660 ng L <sup>-1</sup>	5 ciudades metropolitanas de Korea	[91]

### 1.3 DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS VERDES

La presencia de PBDE y OP en los distintos compartimentos (bióticos y abióticos) está impulsando el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para su determinación [92]. Aún así, hay muy poco desarrollado para estos analitos, principalmente para los OP.

Según lo informado en bibliografía, el análisis de estos contaminantes persistentes y emergentes requieren del uso de técnicas de preparación de muestras y de separación que sean altamente sensibles y selectivas debido, por un lado, a los bajos niveles de concentración en los que se encuentran en el ambiente y, por otro, a la complejidad de las muestras a analizar. Las técnicas de preparación de muestras comúnmente reportadas para la determinación de PBDE y OP de muestras bióticas y abióticas son: la extracción líquido-líquido o LLE (por *liquid-liquid extraction*) [93] y la extracción en fase sólida o SPE (por *solid-phase extraction*) [94]. Sin embargo la LLE y la SPE involucran algunas desventajas tales como procedimientos que consumen mucho tiempo, grandes cantidades de solvente orgánico utilizado, difícil de automatizar, entre otros, en contraposición con los principios de la química verde [95]. Por lo tanto, es necesario disponer de metodologías analíticas verdes que sean rápidas, amigables con el ambiente, eficientes y que permitan su empleo en análisis de rutina.

Por tal motivo, en este trabajo de Tesis Doctoral se desarrollaron metodologías analíticas verdes para la determinación de PBDE en muestras de cabello y leche materna y OP en muestras de agua. Además, se estudió la ocurrencia de 17 PFR y 12 de sus metabolitos en muestras de aguas residuales. A continuación, se explicará de qué se trata la química verde y los 12 principios que la sustentan. Por último, se presentarán las principales técnicas de preparación de muestras utilizadas en los desarrollos de esta tesis y se dará una breve descripción del análisis instrumental de PBDE y OP.

#### LOS 12 PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE

Debido a la preocupación científica y pública sobre la contaminación ambiental, se han introducido prácticas ecológicas en diferentes áreas de la sociedad y la investigación. La química verde es el uso de técnicas y metodologías químicas que reducen o eliminan el uso o generación de materias primas, productos, subproductos, solventes, reactivos, etc., que son peligrosos para la salud humana o el medio ambiente.

En 1991 Anastas, sugirió el término “Química Verde” haciendo referencia al uso de químicos y procesos que reducen los riesgos al ambiente y a los humanos [96]. La química analítica verde es aquella que busca las alternativas que sean más ecológicas para las metodologías analíticas

convencionales [97]. Los 12 principios de la química verde denotados por Anastas [98], son los siguientes:

- 1) Es mejor prevenir el desecho que tratar o limpiar el desecho después de ser formado.
- 2) Los métodos sintéticos debieran ser diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales utilizados en el proceso en el producto final.
- 3) Siempre que sea posible, las metodologías sintéticas debieran ser diseñadas para usar y generar sustancias que posean poca o nula toxicidad en la salud humana y el ambiente.
- 4) Los productos químicos debieran ser diseñados para preservar la eficiencia de la función mientras que reduce la toxicidad.
- 5) El uso de sustancias auxiliares (por ejemplo: solventes, agentes de separación, etc.) debiera hacerse innecesario mientras que sea posible o en su defecto debieran ser inocuas.
- 6) Los requerimientos de energía debieran ser reconocidos por su impacto económico y ambiental y se debieran minimizar.
- 7) La materia prima debiera ser renovable en lugar de agotarse siempre que sea técnica y económicamente posible.
- 8) La derivatización innecesaria (grupos bloqueadores, protección/desprotección, modificación temporaria de procesos químicos o físicos) debieran ser evitados siempre que sea posible.
- 9) Los agentes catalíticos (lo más selectivo posible) debieran ser superiores a los agentes estequiométricos.
- 10) Los productos químicos debieran ser diseñados tal que al final de su función, no persistan en el ambiente y se degraden en productos inocuos.
- 11) Las metodologías analíticas deben desarrollarse aún más para permitir el monitoreo del proceso en tiempo real y un control previo a la formación de sustancias peligrosas.
- 12) Las sustancias y la forma de la sustancia usada en un proceso químico debieran ser elegidas para minimizar el potencial de accidentes químicos incluyendo fugas, explosiones y fuego.

### **1.3.1 ETAPA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

La preparación de muestras ha sido el foco de una investigación intensiva desde la perspectiva de la química analítica verde en los últimos 20 años, ya que es el embudo en los procedimientos analíticos. Vale la pena destacar que el paso de preparación de la muestra determina en gran medida la calidad de los resultados obtenidos y es la principal fuente de errores sistemáticos y la falta aleatoria de precisión de las metodologías analíticas. El paso de tratamiento de la muestra debe garantizar una extracción y recuperación cuantitativa de los

analitos, evitando la contaminación y proporcionando el aislamiento de la matriz en la medida de lo posible, a fin de reducir las posibles interferencias y los efectos de la matriz durante el paso de medición. Debemos notar que no existe una técnica universal de preparación de muestras adecuada para todos los tipos de muestra y que la preparación de la muestra depende de la matriz, la naturaleza de los analitos y el análisis instrumental final. A continuación, se dará una breve descripción de las técnicas de preparación de muestras miniaturizadas que se utilizaron en el presente trabajo de tesis doctoral.

### MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA

La microextracción en fase líquida o LPME (del inglés *liquid-phase microextraction*) es una técnica analítica que surgió de la técnica LLE. La versión miniaturizada de la LLE supera las principales desventajas de la LLE incluyendo tiempo de preparación de muestras relativamente largo, gran consumo de solventes, entre otras. La técnica LPME combina muestreo, extracción, aislamiento y concentración en un solo paso, preservando al mismo tiempo un factor relativamente alto de enriquecimiento del analito. La principal característica que presenta esta técnica es el uso de entre 50-200  $\mu\text{L}$  de solvente de extracción a diferencia de los 10-100 mL de solvente que requiere la LLE [95]. La aplicación es muy amplia y se pueden diferenciar algunas categorías con mayor uso en el ámbito ambiental tales como la microextracción con gota única o SDME (del inglés *single-drop microextraction*), la microextracción con fibra hueca o HF-LPME (del inglés *hollow-fiber liquid phase microextraction*) y la microextracción líquido-líquido dispersiva o DLLME (del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*), siendo esta última una de las más reconocidas en la literatura.

### MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

Fue introducida por Rezaee [99] y colaboradores en el 2006. Está basada en un sistema de solventes ternario en el cual 50-200  $\mu\text{L}$  de un solvente orgánico extractivo poco polar y de densidad alta se mezcla con un solvente orgánico dispersivo que tenga alta miscibilidad con la solución acuosa y con el solvente extractivo. Cuando esta mezcla de solventes es rápidamente inyectada en la solución acuosa de la muestra, se produce una gran turbulencia, provocando una emulsión de micro-gotas en todo el seno de la solución. Luego de la formación de las microgotas, el área superficial entre el solvente extractivo y la solución acuosa se vuelve extenso, acortando el tiempo de extracción a unos pocos segundos [100]. La técnica de extracción no requiere el uso de dispositivos lo que la vuelve una técnica sumamente económica, fácil y rápida. En la **Figura 2** se esquematizan los pasos de una DLLME.

Por otro lado, la versatilidad de la técnica DLLME permite el reemplazo del solvente dispersivo por un tensioactivo transformándose una técnica denominada DLLME asistida por tensioactivo o SA-DLLME (*surfactant assisted*). La diferencia que considera esta técnica con las clásicas técnicas coacervativas es que el tensioactivo cumple la función de emulsificador del solvente orgánico extractivo. Este tensioactivo promueve la formación de micro-gotas de solvente extractivo en el seno de la solución acuosa de la muestra [101].

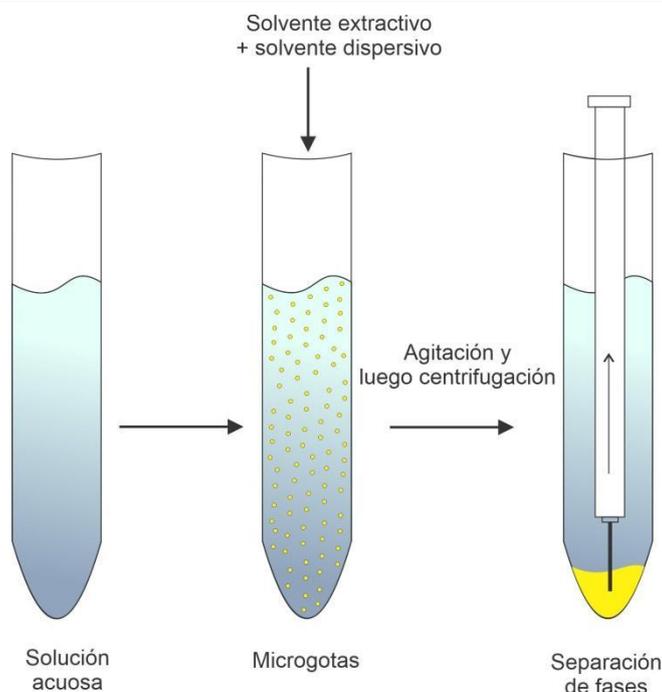


Figura 2. Esquema de la configuración experimental de la microextracción líquido-líquido dispersiva.

### EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ECOAMIGABLES

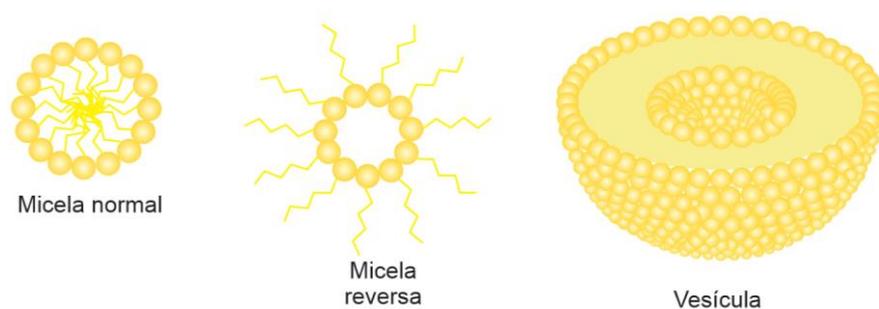
En los últimos años se ha prestado mayor atención al reemplazo de los solventes orgánicos convencionales usados en las técnicas de microextracción en fase líquida para reducir los desechos tóxicos producidos y para mejorar la selectividad y/o la eficiencia de extracción. Con estos objetivos, los solventes no convencionales han sido explorados en las LPME y en los sistemas bifásicos. Estos solventes utilizados incluyen a los tensioactivos, líquidos iónicos o IL (del inglés *ionic liquid*), líquidos iónicos magnéticos y solventes eutécticos o DES (del inglés *deep eutectic solvent*), entre otros menos populares.

### EXTRACCIÓN CON TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos son moléculas anfifílicas con una cabeza polar corta y una cola hidrófoba larga (lineal, ramificada o con anillos aromáticos). Estos compuestos son de gran interés debido a su no-toxicidad. Los tensioactivos se pueden clasificar en aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos

y no-iónicos dependiendo del grupo funcional que se encuentre en la cabeza polar. Los tensioactivos pueden ensamblarse formando agregados como micelas o vesículas en el seno de una solución acuosa u orgánica cuando llegan a su concentración micelar crítica o CMC (del inglés *critical micelle concentration*) [102]. En solventes polares las colas hidrófobas se acomodan hacia el interior de la estructura, formando núcleos no polares. Estos ensambles de tensioactivos se llaman micelas normales o micelas acuosas. En solventes no polares, la micela se forma al revés, en donde la cabeza de los monómeros se encuentran protegidos en el interior de la estructura [103]. En la **figura 3** se esquematizan los distintos tipos de ensamblaje de tensioactivos.

Las técnicas de extracción con tensioactivos más conocidas son la extracción por punto nube o CPE (del inglés *cloud point extraction*) propuesta por Wanabe y Tanaka en 1978 [104] y la extracción coacervativa o CAE (del inglés *coacervative extraction*) que normalmente se lleva a cabo con el uso de tensioactivos aniónicos como el dodecilsulfato de sodio o SDS (del inglés *sodium dodecylsulfate*), el dioctilsulfosuccinato de sodio [103] y el oleato de sodio [105] entre otros. Los coacervatos son líquidos ricos en tensioactivos inmiscibles en agua producidos en soluciones coloidales por la acción de agentes deshidratantes. La técnica CAE implica el uso de tensioactivos iónicos. Los coacervatos en la CAE se forman debido a los cambios de pH en la solución y/o la adición de electrolitos o solventes miscibles en agua en el que la macromolécula del tensioactivo tiene baja solubilidad. Por otro lado, si el coacervado se obtiene a partir de tensioactivos zwitteriónicos o no iónicos debido al cambio de la temperatura de la solución, la técnica de extracción se llama CPE [103], la cual es más conocida y ha sido más estudiada que la CAE. Los coacervatos involucran la coagulación, la diferencia entre coacervación y precipitación radica en la cantidad de solvente retenido en la fase rica en polímero [103].



---

*Figura 3. Formas de agregación de las micelas, dependiendo de su CMC y el medio en el que se encuentran.*

## TÉCNICAS PARA ASISTIR EXTRACCIONES

Las técnicas instrumentales para asistir extracciones no son técnicas analíticas separativas, sino que cumplen la función de aumentar la eficiencia de la técnica extractiva reduciendo o eliminando el uso de solventes, cambiando ciertas condiciones físicas del sistema. Entre estas condiciones se encuentran el uso de alta presión, temperaturas, microondas y ondas ultrasónicas. Estos cambios permiten que la viscosidad del solvente disminuya y se acelere la transferencia de masa desde la muestra hacia el solvente. La mejora en la eficiencia de la técnicas asistidas hacen que sean las técnicas de extracción eco-amigables más frecuentemente utilizadas. Existen distintas técnicas para asistir a las extracciones. Entre las más conocidas se pueden diferenciar: la extracción asistida por ultrasonido o UAE (del inglés *ultrassound-assisted extraction*), la extracción asistida por microondas o MAE (del inglés *microwave-assisted extraction*) y la extracción con fluidos presurizados o PLE (del inglés *pressurized liquid extraction*).

La UAE es una técnica que se basa en la aplicación de energía ultrasónica (20 kHz – varios GHz) para facilitar la transferencia de masas entre fases inmiscibles sometidas a dicha radiación. La principal fuerza impulsora de la energía ultrasónica para los efectos de la extracción en medios líquidos es la cavitación acústica. La cavitación acústica es el fenómeno de formación, expansión y colapso implosivo de micro-burbujas en líquidos irradiados con ultrasonido [106]. Las principales ventajas de la UAE son ahorro del tiempo en la extracción, reproducibilidad alta lo que resulta en una mejor calidad del extracto y recuperaciones altas [107].

Otras técnicas para asistir extracciones pero menos usada, es la extracción asistida por vórtice o VA (del inglés *vortex-assisted*) basado en la agitación de la muestra para fomentar la transferencia de masa entre la muestra y el solvente extractivo.

## EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La técnica de SPE es ampliamente usada en la preparación de muestras para determinar POP en muestras ambientales y biológicas. Los objetivos de la SPE son la retención y elución de analitos, la eliminación de sustancias interferentes en la matriz y/o contaminantes y la concentración de la muestra [107]. Se basa en la partición de los solutos entre dos fases, una líquida (matriz de la muestra) y una fase sólida (sorbente). Las desventajas que tiene esta técnica son:

- Se utilizan grandes volúmenes de solventes orgánicos para acondicionar el sorbente y para eluir los analitos.

- Una fuerte adsorción de los analitos en el sorbente puede prevenir la elución.
- Relativamente alto costo, debido al único uso de cada sorbente.
- La necesidad de eliminar interferentes de la matriz pueden provocar bloqueos en los canales entre los granos del sorbente [108].

Existen diferentes tipos de dispositivos para SPE. El primer tipo de dispositivo es el típico cartucho de SPE que consiste en un barril de jeringa que puede ser de polipropileno. Las fritas que forman el lecho del cartucho pueden ser de polietileno o acero inoxidable con una porosidad entre 10-20  $\mu\text{m}$  y ofrecen una pequeña resistencia al flujo. El segundo tipo es el disco de SPE que combina las ventajas de las membranas y el SPE. Los discos y los cartuchos difieren principalmente en su radio de  $L/d$  (longitud – diámetro) donde los discos tienen un radio de  $L/d < 1$  y los cartuchos tienen un  $L/d > 1$ . Esta característica permite velocidad de flujo mayores y extracciones más rápidas en los discos [109].

### **1.3.2 ETAPA DE LIMPIEZA DEL EXTRACTO**

La naturaleza no selectiva de las técnicas de extracción y la complejidad de la matriz de la muestra dan como resultado extractos complejos. Estos extractos requieren una etapa posterior de limpieza del extracto previo al análisis instrumental, no sólo para asegurar la viabilidad de la separación analítica, sino también para minimizar los efectos de matriz y reducir las interferencias, aumentando la sensibilidad y la exactitud del método [13]. En la determinación elemental, esta etapa no es necesaria dado que las técnicas separativas son destructivas. En el caso de la determinación de compuestos orgánicos (moléculas) las técnicas separativas deben ser no destructivas, y por tal motivo, la etapa de limpieza es esencial.

Las principales interferencias a eliminar en el caso de las muestras bióticas son los lípidos. Las técnicas de limpieza aplicadas a la determinación de PBDE y OP a partir de muestras bióticas pueden incluir digestión ácida o cromatografía por permeación en gel o GPC (del inglés *gel permeation chromatography*), seguidos de cromatografía en columna usando variedad de sorbentes. La eliminación del contenido de lípidos y compuestos orgánicos de las muestras ambientales sólidas (polvo, suelo, sedimentos, lodos y biosólidos) es esencial para lograr una buena sensibilidad analítica y detección de los analitos. Se han descrito varios métodos en la literatura para la eliminación de lípidos. La sílice impregnada con ácido sulfúrico se ha utilizado con éxito para eliminar los lípidos de los extractos [110] en la determinación de PBDE. El uso de columnas de sílice acidificada aumenta el rendimiento de la muestra y permite el uso de una gran variedad de solventes de elución. La sílice activa en la parte superior de los cartuchos de limpieza es esencial ya que permiten la retención de material biogénico polar proveniente de las muestras

biológicas. La sílice activa actúa como una capa atrapante del colesterol e impide la conversión del colesterol a colesteno, resistente a los ácidos en la capa de sílice acidificada [7].

Los extractos de suelo, sedimentos y lodos residuales a menudo contienen azufre elemental, que puede dificultar la detección de la mayoría de los BFR y que, por lo tanto, debe eliminarse. Se ha informado que tanto el GPC como el polvo de cobre son eficientes para la eliminación de azufre. El polvo de cobre podría agregarse como un paso de limpieza en una columna llena de capas múltiples durante la limpieza de la muestra [13].

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, existen diferentes métodos para eliminar restos de agua de las muestras, el cual es un interferente importante en equipos de cromatografía gaseosa. Los extractos se pueden pasar a través de una capa fina de sulfato de sodio anhidro la cual puede estar incluida en los cartuchos de limpieza [111], o puede realizarse de forma separada en pipetas Pasteur que contengan una capa de aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro [112] colocando la muestra y haciéndola pasar por el lecho. Para mejorar este proceso se pueden colocar los cartuchos bajo un suave vacío con bombas de vacío [113].

### **1.3.3 ANÁLISIS INSTRUMENTAL: SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS**

En la presente sección se resumen las diferentes técnicas separativas publicadas para la determinación de PBDE y OP en matrices bióticas y abióticas (**Tabla 8**). Como se mencionó en la sección de preparación de muestras, de lo reportado en literatura, el análisis requiere el uso de técnicas separativas sensibles y selectivas debido, por un lado, a las bajas concentraciones en las que estos contaminantes son hallados y, por otro, a la complejidad de dichas matrices. Tras una eficaz extracción de los PBDE y OP y limpieza del extracto, el análisis tiene lugar normalmente mediante técnicas cromatográficas.

Los PBDE son usualmente determinados mediante el análisis instrumental basado en cromatografía gaseosa o GC (del inglés *gas chromatography*) dado sus valores de presión de vapor y su polaridad. En el caso del BDE-209, se debe prestar especial atención dado que es termolábil y puede degradarse en el equipo instrumental [92]. Por tal motivo, el BDE-209 puede ser determinado mediante cromatografía líquida o LC (del inglés *liquid chromatography*). Por otro lado, los OP exhiben una amplia gama de propiedades fisicoquímicas, lo que explica la posibilidad de analizar mediante GC a los más volátiles y por LC a los más polares.

De acuerdo a la información reportada, hay 3 sistemas de inyección mayormente empleados para la determinación de PBDE y OP mediante GC: a) sin división [46,114–116], b) en columna [117,118] y c) vaporización a temperatura programada o PTV (del inglés *programmed temperature vaporizing*) [5,119,120]. En el uso de la inyección sin división, la transferencia de los

analitos depende del tipo de solvente utilizado, el volumen del *liner* y el volumen de inyección [19]. Los parámetros de gran importancia en términos cromatográficos para la determinación de PBDE y OP, es la temperatura del puerto de inyección (usualmente entre 250 y 300°C) y el tiempo de residencia en el inyector. Si el tiempo de residencia de los compuestos en el *liner* es muy largo, puede ocurrir la degradación de los congéneres más bromados (octa- a deca-BDE) [19] y de algunos OP. De acuerdo a lo reportado, se considera que el menor volumen de inyección que se puede inyectar usando modo sin división es entre 1 y 3 µL.

Otra etapa crucial en la determinación de PBDE y OP por GC es la selección de una columna apropiada para la separación. Esto permite una resolución apropiada así como también la discriminación de los compuestos. Los PBDE son principalmente separados con columnas capilares compuestas de fase estacionaria muy poco polar como la DB-5 o la VF-5 (5% difenil y 95% dimetilsiloxano) de 30-50 m de largo y diámetros <0,25 mm [19]. Por otro lado, la programación de la temperatura en el horno de la columna es un parámetro importante que influye también en la separación de los PBDE (no debe exceder los 300 °C). En cuanto a los OP, las columnas que más se utilizan son las poco polares como la BP-5 o CB-5 que contienen 5% fenil-metilpolisiloxano y no polares tales como la CB-1, OV-1 la cual consta de 100% dimetilpolisiloxano. También se ha reportado el uso de columnas medianamente polares como la DB-1701 o SPB-1701 que contienen 14% cianopropil-fenil metilpolisiloxano.

Los PBDE han sido mayormente detectados y cuantificados mediante ionización negativa de captura de electrones o ECNI (del inglés *electron capture negative ionization*) con espectrometría de masas o MS (del inglés *mass spectrometry*). El equipo ECNI-MS ofrece alta sensibilidad y menor costo que otras alternativas de alta resolución como el impacto de electrones o EI (del inglés *electron impact*). Sin embargo, EI-MS presenta mayor selectividad que ECNI-MS ya que registra la masa precisa de cada fragmento y permite el uso de estándares etiquetados con <sup>13</sup>C. Como alternativa al MS, descrita como la técnica de detección más aplicada para PBDE se encuentra el detector de captura de electrones o ECD (del inglés *electron capture detector*). El ECD garantiza límites de detección bajos, dado su alta sensibilidad a compuestos que contienen elementos electronegativos en sus moléculas. El uso de este tipo de detección (basado únicamente en el tiempo de retención) es difícil en muestras complejas que contienen otros compuestos de cloro o bromo, que puedan ser detectados al mismo tiempo que los PBDE pero muy efectivo en cuanto a los límites de detección que se pueden obtener [121].

Muchos de los PBDE de alto peso molecular son compuestos sensibles a la temperatura. Sin embargo, las altas temperaturas en los puertos de inyección y columnas capilares de GC son inevitables en la determinación de los compuestos octa-, nona- y deca-BDE. Como alternativa al GC Se ha reportado el uso de LC acoplado a detección UV y a MS. La detección UV tiene

ventajas tales como bajo costo y su instrumental es simple. Sin embargo, esta detección tiene baja selectividad lo cual limita su aplicación al análisis de muestras complejas. El MS también es utilizado como detección acoplada a LC. Normalmente el MS está equipado con ionización química a presión atmosférica o APCI (del inglés *atmospheric pressure chemical ionization*) y fotoionización a presión atmosférica [122]. Sin embargo, la LC se usa sólo en el 14% de las metodologías reportadas [92]. La resolución cromatográfica que otorga la LC no alcanza la capacidad máxima promedio de la GC, por lo tanto, el número de componentes que podrían ser analizados por LC sería menos que para GC [92].

Para el análisis de los OP por GC, se han utilizado diferentes detectores incluyendo al detector fotométrico de llama o FPD (del inglés *flame photometric detector*) o el detector de fósforo nitrógeno NPD (del inglés *nitrogen phosphorus detector*) y MS. La técnica separativa GC más utilizada ha sido utilizado EI-MS. Dado que no siempre se ven los espectros de EI, a menudo se recomienda la técnica complementaria de ionización química o CI (del inglés *chemical ionization*) [123].

En cuanto al análisis de los OP por LC, generalmente se utilizan gradiente de mezcla de solventes de fase móvil tales como las mezclas metanol-agua o acetonitrilo agua. La LC se adapta particularmente al análisis multiresiduo de una gran gama de polaridades incluyendo sus productos de transformación sin la necesidad de derivatizar ningún compuesto. La LC tiene una gran variedad de modos de separación analítica y fases móviles para optimizar. La fase estacionaria que más se utiliza para OP es la fase reversa o RP (del inglés *reverse phase*) con sílica alquil-enlazada. La mayoría de las metodologías analíticas para determinar OP que presenta la Agencia de Protección Ambiental (EPA) se basan en el uso de LC. Las razones se basan en que las columnas con fase estacionaria C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> se pueden usar ampliamente con un simple gradiente de fase móvil con agua y metanol o acetonitrilo y se pueden separar compuestos con un amplio rango de polaridad. Las medidas más comunes para estas columnas son 25 cm x 0,46 mm d.i. empacadas con 5-10 µm de partículas de sílica C<sub>18</sub>. Este largo de columna asegura una eficiencia suficiente de columna para separar un gran número de OP en una corrida. La calidad del agua y solventes que se utilice en la fase móvil así como de cualquier otro reactivo es muy importante en la determinación de trazas, especialmente cuando se utiliza UV como detector. Por otro lado, es importante utilizar solventes con absorción UV baja a longitudes de onda bajas. Cuando la detección se lleva a <200 nm se debe preferir el acetonitrilo en vez del metanol.

La **Tabla 8** presenta las cifras de mérito analítico para cada metodología analítica para determinar PBDE y OP en muestras bióticas y abióticas reportadas en bibliografía.

Tabla 8. Metodologías analíticas y sus cifras de mérito analítico para determinar PBDE y OP en muestras bióticas y abióticas.

Éteres de difenilo polibromados								
Técnica instrumental	Técnica de extracción	Muestra	PBDE analizados	Rango lineal	LOD	Recuperación [%]	RSD [%]	Ref
RP-HPLC <sup>6</sup> -UV	SDME	Agua de grifo	BDE-209	1-1*10 <sup>3</sup> ng mL <sup>-1</sup>	0,7 ng mL <sup>-1</sup>	93-103	4,8	[124 ]
RP-HPLC-UV	SBSE <sup>7</sup> -UAE	Suelo	BDE-28, -47, -99, -100, -153	15-500 ng mL <sup>-1</sup>	2,9-4,2 ng mL <sup>-1</sup>	70-115	3,1-11	[125 ]
GC-MS/MS	PLE	Plantas	BDE-17, -47, -66, -100, -153, -183	-	0,1-0,7 ng g <sup>-1</sup>	81-108	< 10	[126 ]
GC-ICP <sup>1</sup> -MS	HF-LPME	Suelo y suero	BDE-28, -47, -99, -100	0,2-20 ng mL <sup>-1</sup>	0,02-0,04 ng mL <sup>-1</sup>	85-112	5,1-9,1	[127 ]
GC-MS/MS	CPE-UABE	Agua de río y de lago	BDE-47, -99, -100, -153	4-150 pg mL <sup>-1</sup>	1-2 pg mL <sup>-1</sup>	>99	≤ 8,3	[6]
RP-HPLC-UV	SFO <sup>8</sup> -ME	Agua de grifo Orina humana	BDE-28, -47, -99, -154, -183, -209	0,5-500 ng mL <sup>-1</sup>	0,1-0,4 ng mL <sup>-1</sup>	81-118 92-116	0,8-7,3 1,1-7,8	[128 ]
GC-APCI-MS/MS	QuEChERS <sup>9</sup>	Suero y agua	BDE-28, -47, -99, -154, -153, -183, 209	1-1*10 <sup>3</sup> pg mL <sup>-1</sup>	0,04-30 pg mL <sup>-1</sup>	83-118	21,1	[129 ]

<sup>6</sup> HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (del inglés *high performance liquid chromatography*)

<sup>7</sup> SBSE: extracción sortiva con barra de agitación (del inglés *stir bar sortive extraction*)

<sup>8</sup> SFO: solidificación de la gota orgánica flotante (del inglés *solidifying floating organic droplet*)

<sup>9</sup> QuEChERS: extracción rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura (del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

GC-MS/MS	US- DSPE <sup>10</sup> - DLLME	Sedimento	BDE-47, -99, -100, - 153	0,07-1*10 <sup>3</sup> ng g <sup>-1</sup>	0,02-0,06 ng g <sup>-1</sup>	≥80	4,7-9,8	[130 ]
GC-MS	Óxido de grafeno disperso en sílica ácida	Diferentes vegetales	BDE-28, -47, -66, -77, -99, -100, -153, -154, -183, -209	5-500 ng g <sup>-1</sup>	0,17-1,8 ng g <sup>-1</sup>	90-108	0,9-5,9	[131 ]
GC-ECD	MSPD <sup>11</sup>	Grasa de res y de pollo y músculo de pez	BDE-47, -85, -100, - 99, -154, -153	2-200 ng g <sup>-1</sup>	0,4 ng g <sup>-1</sup>	74-99	2-10	[132 ]
RP-HPLC	DLLME	Agua y lixiviado de vertederos	BDE-28, -47, -99, - 209	0,05-100 ng mL <sup>-1</sup>	0,01-0,06 ng mL <sup>-1</sup>	87-119	3,8-6,3	[133 ]
GC-MS/MS	US-DSPE	Peces Boga, Patí, Surubí, Moncholo	BDE-47, -100, -99, - 153	0,05-5*10 <sup>3</sup> ng g <sup>-1</sup>	0,009-0,044 ng g <sup>-1</sup>	75-114	8,7-11	[134 ]

<sup>10</sup> DSPE: extracción en fase sólida dispersa (del inglés *dispersive solid phase extraction*)

<sup>11</sup> MSPD: dispersión de matriz en fase sólida (del inglés *matrix solid-phase dispersion*)

GC-MS/MS	US-DLLME-SFO	Sedimento	BDE-47, -100, -99, -153	$2 \cdot 10^{-3} \text{ ng g}^{-1}$	$5.10^{-4} - 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ ng g}^{-1}$	71-104	3,5-9,2	[14]
GC-ECD	SPE-DLLME	Agua de río y mar	BDE-28, -47, -85, -99,	$100-5 \cdot 10^5 \text{ ng mL}^{-1}$	$30-150 \text{ ng mL}^{-1}$	67-94	4,2-7,9	[113]
		Hojas de trébol	-100, -153, -154	$0,1-20 \text{ ng g}^{-1}$	$0,04-0,16 \text{ ng g}^{-1}$	66-92	5,9-11	
<b>Pesticidas Organofosforados</b>								
RP-HPLC-DAD	UASEME <sup>12</sup>	Agua	(isoC, FM, PA, FO, FE, FF, mPA) <sup>13</sup>	$1-200 \text{ ng mL}^{-1}$	$0,1-0,3 \text{ ng mL}^{-1}$	83-106	3-6	[135]
UPLC <sup>14</sup> -UV	IL-DLLME	Agua de río	PA, mPA, (PFF, CPF) <sup>15</sup>	$1-500 \text{ ng mL}^{-1}$	$0,7-2,7 \text{ ng mL}^{-1}$	96-114	0,7-4,9	[136]
GC-MS	SPE	Vegetales <sup>16</sup>	CPF( MA, TBF, TZF) <sup>17</sup>	$0,5-500 \text{ ng g}^{-1}$	$0,033-0,136 \text{ ng g}^{-1}$	89-99	1,5-4,7	[137]
GC-MS	US-VA-DLLME	pavo, conejo, pollo, besugo, soja, pera, ciruela	(MTC, PF, PT, SF, DZ, ETP, DCF, mCPF, mPMF, ePA, ePMF, BMF, CVV, eBMF,	$5-1 \cdot 10^3 \text{ ng g}^{-1}$	$0,2-1,3 \text{ ng g}^{-1}$	85-109	$\leq 8,7$	[138]

<sup>12</sup>UASEME: Microextracción de emulsificación mejorada con tensioactivos asistida por ultrasonido (del inglés *ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction*)

<sup>13</sup>ISOc: isocarbofos, FM: fosmet, PA: paratión, FO: foxim, FE: fenitrotión, FF: fenofos, mPA: metil paratión

<sup>14</sup>UPLC: cromatografía líquida de ultra resolución (del inglés *ultra performance liquid-chromatography*)

<sup>15</sup>PFF: profenofos, CPF: clorpirifos

<sup>16</sup>Vegetales: arvejas, repollo, tomate, berenjena

<sup>17</sup>MA: malatión, TBF: terbufos, TZF: triazofos

			STF, DT, CF) <sup>18</sup> MA, CPF					
UPLC-MS/MS	VA-DLLME	Té de hierbas chino	(DV, mTCF, EFF, ET) <sup>19</sup> , PFF, FO, mCPF, CPF	0,1-25 ng mL <sup>-1</sup>	1.10 <sup>3</sup> -0,01 ng mL <sup>-1</sup>	70-116	≤8,54	[139]
GC-FPD y GC-MS	QuEChERS	Frutillas	DM <sup>20</sup> , DZ, mCPF, mPA, MA, CPF, CVV	25-250 ng g <sup>-1</sup>	3,6-3,8 ng g <sup>-1</sup>	72-115	<12	[140]
GC-MS	IL-DLLME	Agua	DM, (DS, FM, SFT, TN, TE) <sup>21</sup> , PA, mPA, PT	-	5*10 <sup>3</sup> -0,02 ng mL <sup>-1</sup>	85-118	4,1-9,7	[141]
GC-MS	MD <sup>22</sup> -μSPE	Agua de río, pozo y residual	FNT <sup>23</sup> , MA, CPF	2-1*10 <sup>3</sup> ng mL <sup>-1</sup>	0,46-1 ng mL <sup>-1</sup>	70-81	3-16	[142]
UPLC-MS/MS	MWCNT <sup>24</sup> -SPE	Agua de río	(MCT, MTD, OMT, ISZ) <sup>25</sup> DM, DV, isoC, MA, FO	1*10 <sup>-3</sup> -0,02 ng mL <sup>-1</sup>	2*10 <sup>-5</sup> -1*10 <sup>-3</sup> ng mL <sup>-1</sup>	88-125	0,12-21	[143]

<sup>18</sup> MTC: metacrifos, PF: pirofos, PT: forato, SF: serafos, DZ: diazinon, ETP: etrimfos, DCF: diclofenón, mCPF: metil clorpirifos, mPMF: metil pirimfos, ePA: etil paratión, ePMF: etil pirimfos, BMF: etil bromofos, CVV: clorveninfos, eBMF: etil bromofos, STF: estirifos, DT: dietón, CF: cumafos)

<sup>19</sup> DV: diclorvos, mTCF: metil tolcofos, EFF: edifenfos, ET: etiión

<sup>20</sup> DM: dimetoato

<sup>21</sup> DS: disulfotón, FM: famfur, SFT: sulfotep, TN: tionazina, TE: trietil tiofosfato

<sup>22</sup> MD: dispersión magnética (del inglés *Magnetic Dispersion*),

<sup>23</sup> FNT: fentiión

<sup>24</sup> MWCNTs: nanotubos de carbón de paredes múltiples (del inglés *Multi-walled carbon nanotubes*)

<sup>25</sup> MCT: monocrotofos, MTD: metidatiión, OMT: ometoato, ISZ: isazofos

GC-FPD	M <sup>26</sup> -SPE	Agua de río	MA, CPF, isoC, PFF	50-5*10 <sup>3</sup> ng mL <sup>-1</sup>	16-33 ng mL <sup>-1</sup>	90-103	0,4-10	[144 ]
GC-MS	3D-GA <sup>27</sup> - SPE	Agua de grifo, río, lago	DM, PA, FE, FNT, (TCF, EPP) <sup>28</sup>	0,5-500 ng mL <sup>-1</sup>	0,12-0,58 ng mL <sup>-1</sup>	94-104	1,1-5,6	[145 ]
HPLC-UV	UA-IL- DLLME	trigo	FE, FNT, FO	0,1-100 µg g <sup>-1</sup>	0,1 µg g <sup>-1</sup>	72-116	0,6-6,3	[146 ]
GC-FPD	UASEME	agua de grifo y miel	EPP, FE, MA, CPF, isoC, MTD, PFF, TZF	0,5-50 ng mL <sup>-1</sup>	5.10 <sup>3</sup> -0,05 ng mL <sup>-1</sup>	82-97	2,4-9,3	[147 ]
GC-FPD	USAE	<i>Salvia miltiorrhizae</i>	DV, DZ, OMT, MCT, DM, MA, mPA, PA, MTD, ET	10-5*10 <sup>3</sup> ng mL <sup>-1</sup>	1-2 ng g <sup>-1</sup>	71-101	<6,8	[148 ]
GC-MS	QuEChERS	Vegetales <sup>29</sup>	PA, mPA, FE, TZF, DZ, DM, FNT, MA	10-1.10 <sup>3</sup> ng mL <sup>-1</sup>	0,13-7,1 ng g <sup>-1</sup>	70-116	<19,7	[149 ]

<sup>26</sup> M: magnético

<sup>27</sup> 3D-GA: aerogel de grafeno en 3 dimensiones (del inglés, *three dimensional graphene aerogel*)

<sup>28</sup> EPP: etoprofos, TCF: triclorfón

<sup>29</sup> Vegetales: manzana, pera, tomate, repollo y pepino

### **1.3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA**

En química analítica, la optimización es una etapa crítica para encontrar el valor que cada factor debe tener para producir la mejor respuesta posible. Se debe realizar asegurando un buen rendimiento en las metodologías analíticas que se han desarrollado. En este contexto, los diseños de experimentos multivariados (DEM) son una importante herramienta porque conlleva menores tiempo, esfuerzo y recursos que los procedimientos univariados y facilita la colección de grandes cantidades de información minimizando el número de experimentos [150]. Los DEM y las metodologías de superficie de respuesta (MSR) han demostrado ser útiles para desarrollar, mejorar y optimizar procesos. La superficie de respuesta ha sido extensamente utilizado en metodologías analíticas [14,151,152], como así también en aplicaciones industriales [153] y en bioprocesos [154].

Luego de un primer escaneo, se construye el diseño de superficie de respuesta que proporciona datos que generalmente deben modelarse mediante el ajuste de mínimos cuadrados o, excepcionalmente, mediante redes neuronales artificiales. Cuando se optimiza una gran cantidad de respuestas (siguiendo criterios apropiados), la función de deseabilidad es la herramienta más popular [155,156].

Una cuidadosa optimización de la metodología analítica requiere el desarrollo de las siguientes etapas que influyen en la eficiencia de la extracción y separación de los componentes:

a) Selección de los factores que están involucrados en el proceso de optimización:

- Tipo de solvente orgánico, su densidad y polaridad, ambas de las cuales determinan la capacidad del solvente para penetrar en la matriz. El principal rol del solvente de extracción es solubilizar a los analitos de interés así como eliminar la co-extracción de interferentes de la matriz [19], por lo que el volumen de solvente también juega un rol importante en el proceso de extracción.

- El tiempo de extracción del proceso y el número de ciclos en el caso de UAE o PLE [19].

- La temperatura de extracción del proceso. La eficiencia aumenta cuando se aumenta la temperatura debido a la disminución de la viscosidad del solvente que permite una mejor permeación dentro de la superficie de la matriz. Pero, por otro lado, temperaturas muy altas pueden aumentar la co-elución de interferentes [19].

- El tipo de detección analítica que se requiere dependiendo de la naturaleza de los analitos y de la matriz y los parámetros instrumentales necesarios para una separación y detección eficiente. En este caso se debe tener en cuenta si es una separación analítica en GC o en LC. Para cada caso, corresponden diferentes parámetros tales como temperatura de inyección, temperatura de separación, presión en el espacio de cabeza, tipo de columna y sorbente, etc. Para GC. Para LC algunos de los parámetros a tener en cuenta son tipo y material de la columna, tipo y composición de fase móvil y gradiente de separación entre otros.

b) La respuesta que se evaluará en la etapa de optimización:

Durante el desarrollo de un proceso de optimización, el modelo generado evidencia una relación entre una respuesta y los factores. Los exponentes demuestran si el modelo es lineal, cuadrático o cúbico, y los valores y las señales de los coeficientes permiten una interpretación de la influencia de estos factores en la respuesta. Eventualmente, muchos procesos de optimización de métodos analíticos involucran determinaciones de elementos múltiples que producen varias respuestas. Por lo tanto, se requieren múltiples respuestas para establecer el modelo en estas condiciones. La función de respuesta múltiple más empleada por los químicos analíticos es la función de deseabilidad D [151].

c) Definición del dominio experimental de los factores:

Los dominios experimentales deben establecerse con criterio porque los resultados y conclusiones obtenidos de un diseño experimental se limitan a los dominios de los factores. No se pueden inferir conclusiones fuera del rango experimental estudiado [151].

d) Evaluación preliminar de los factores que influyen en el proceso:

Frecuentemente la evaluación de los efectos de los factores de un proceso se hace mediante un diseño factorial completo de dos niveles. Sin embargo, cuando el número de factores es muy grande, una opción conveniente es un diseño factorial fraccionado que disminuye el número de experimentos a realizar [151].

e) Selección del método de optimización:

El paso de optimización de los métodos analíticos se realiza a menudo utilizando técnicas multivariadas. El diseño factorial completo de dos niveles permite una evaluación preliminar de los factores mediante el desarrollo de modelos lineales. Sin embargo, las condiciones críticas de los factores se han logrado utilizando metodologías de superficie de respuesta como la matriz de Doehlert, Diseño Central Compuesto o CCD (del inglés *central composite design*), Diseño Box Behnken o BBD (del inglés *Box Behnken design*) y diseños factoriales de 3 niveles que permiten

la obtención de modelos cuadráticos. Todas estas herramientas tienen sus ventajas e inconvenientes y proporcionan mejores resultados que la metodología de optimización univariada [157].

Asimismo, muchas veces es inevitable realizar la optimización de las variables mediante el método univariado. En los métodos univariados se definen las variables propias del sistema que deben ser optimizadas en la técnica. En un primer ensayo, se define una sola de ellas como variable dependiente, y las demás variables, son asumidas como variables independientes. De este modo, sólo se modifican los valores de la variable dependiente por cada ensayo realizado en función de variables independientes y fijas.

Si bien este método no asegura que los valores óptimos sean localizados, cuando se trata de una técnica nueva o de una nueva aplicación de dicha técnica es conveniente utilizar el método univariado, debido a que para poder optimizarla se requiere conocimiento del funcionamiento fisicoquímico del sistema a tratar, para luego poder fijar los rangos de valores de cada variable en los que nos podemos mover obteniendo resultados en función de la respuesta deseada. El factor de respuesta relativa (RR) es un parámetro crítico ampliamente utilizado en los procedimientos cromatográficos para optimizar las variables en estudio. La RR, el cual es específico para un set de condiciones experimentales, compara la respuesta analítica mayor, con las demás respuestas analíticas obtenidas en el mismo set de experimentos, como se muestra a continuación:

$$RR(\%) = \frac{\text{mayor señal analítica}}{\text{señal analítica}} \times 100$$

Donde RR(%) es la respuesta relativa porcentual para cada analito, calculada como la relación entre la mayor señal analítica (obtenida del área del pico cromatográfico, comparado entre los mismos analitos) obtenido de una serie de ensayos, con respecto a la señal analítica (área del pico) de los demás ensayos. Al multiplicarlo por 100, obtenemos el porcentaje de RR.

Como consecuencia, para poder conocer y seguir estos pasos, es necesario considerar en primer instancia el objetivo de los experimentos. Teniendo en cuenta el objetivo, se puede continuar con todo el desarrollo.

### **1.3.5 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS DATOS Y VALIDACIÓN**

Un método es un procedimiento analítico exactamente definido que incluye (i) todas las etapas de preparación de la muestra, (ii) el instrumento utilizado y (iii) las ecuaciones de calibración aplicadas para estimar la concentración del/los analitos en la muestra analizada. En un sistema de calidad, este "procedimiento analítico definido" se describe en el denominado procedimiento

operativo estándar. La validación del método es el establecimiento de una base de datos experimental que certifica el desempeño de un método analítico. La validación de un método analítico está primeramente comprometida con la identificación de las fuentes y la subsecuente cuantificación de los potenciales errores del método [158]. Para los métodos desarrollados internamente por un laboratorio, la validación (interna) normalmente ocurre inmediatamente después de las fases de desarrollo. Dado que las actividades del control de calidad o QC (del inglés *quality control*) están destinadas a determinar si un sistema analítico está bajo control estadístico, es decir, si las características de rendimiento determinadas se mantienen durante su vida útil operativa, la validación también es el punto de partida para planificar el QC interno durante el uso del método de rutina. El trabajo experimental para validar un método analítico debe seguir un proceso documentado, como un plan de validación que decida de antemano qué características de rendimiento deben considerarse. El alcance de la validación depende principalmente del tipo de método, en otras palabras, del propósito del método [159].

### *SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD*

La selectividad suele ser el primer parámetro de validación que se determina. Cuando el analista comienza a desarrollar la determinación de un determinado analito basado en la medición de su señal, debe asegurarse de que la respuesta adquirida se deba solo a la presencia del analito en la muestra investigada. Según la IUPAC, la selectividad de un método es el grado en que se puede determinar analitos particulares en una mezcla compleja sin interferencia de otros componentes en la mezcla [160]. En otros términos, la selectividad es el grado en que un método puede identificar y cuantificar el analito con precisión en presencia de sustancias interferentes.

Los términos selectividad y especificidad frecuentemente se usan indiscriminadamente, pero difieren esencialmente en sus significados. La especificidad es descrita por la IUPAC como la máxima selectividad: es un término absoluto y, por lo tanto, no puede ser calificado. El término especificidad sugiere que ningún componente que no sea analito contribuye al resultado. Casi ningún método es tan específico y, en general, debe evitarse el término especificidad [159].

### *PRECISIÓN Y EXACTITUD*

Otro parámetro estadístico es la precisión y la exactitud. La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea [161].

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar,  $\sigma$ , estimada analíticamente por  $s$  o más comúnmente como la desviación estándar relativa o RSD (del inglés *relative standard deviation*) o coeficiente de variación. El estimador  $s$  de la desviación estándar se calcula como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde  $n$  es el número de medidas,  $X_i$  es el valor medido en el ensayo  $i$  y  $\bar{x}$  el estimador de la media poblacional  $\mu$ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por otra parte, la RSD o coeficiente de variación se calcula como:

$$RSD = \frac{s * 100}{\bar{x}}$$

Ambos estimadores,  $s$  y RSD permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media).

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Matemáticamente, suele expresarse de los siguientes modos:

$$B = \bar{X} - \hat{X}$$

$$B\% = \frac{B}{\bar{X}} * 100$$

$$R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} * 100$$

Donde  $\bar{x}$  es el valor medio y  $\hat{x}$  es el valor verdadero. El caso de  $R$ , que es la recuperación, es la más utilizada. La exactitud de un método analítico habla de la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia. De esta manera, es posible independizarse del término "valor verdadero" usado en estadística cuyo significado es diferente.

La precisión de un sistema analítico y la precisión de un método generalmente están definidas de manera separada. Esto es debido a que la precisión proporciona la información sobre los errores asociados a la instrumentación y la exactitud provee información sobre el método

completo. La diferencia entre ambos dos surge de los errores asociados a la preparación de las muestras. En contraste, la precisión del método se determina por la repetición del análisis de una única muestra homogénea.

### *CALIBRACIÓN*

Un paso importante en la validación de un método analítico es el establecimiento de la relación matemática entre la medida de la respuesta ( $y_i$ ) y la concentración del analito ( $C_i=x_i$ ). Una vez que esta relación se ha establecido, el instrumento analítico o el método deben ser calibrados. El procedimiento de calibración dependerá del tipo de método, ya sea un método instrumental o no, del tipo de muestra, del grado de exactitud y precisión requeridas y del rango concentración de los analitos de interés. Normalmente, la función de respuesta que relaciona la señal analítica (en los equipos cromatográficos) y la concentración es lineal de acuerdo a la ecuación  $y_i=bx_i+a$ . En el caso de ser necesario, también puede calcularse el coeficiente de correlación usando un test  $t$  con dos colas.

### *ESTÁNDAR INTERNO*

El estándar interno o IS (por *internal standard*) es un compuesto agregado similar al/los analitos de interés en cuanto a composición química, separación y medición y debe considerarse representativo del analito [162]. El IS debe estar ausente o en una concentración inicial insignificante en la muestra. La aplicación original del IS fue aplicado al GC, usado primeramente para corregir errores de la inyección manual. La práctica de incluir IS fue luego extendida a la LC, MS y otras técnicas relacionadas. Cuando se incluyen IS, la respuesta analítica se define por la relación del pico (altura o área):

$$Pr, i = \frac{y_i}{y_{IS}}$$

Donde  $y_i$  e  $y_{is}$  son las respuestas obtenidas de los analitos y del IS, respectivamente [162].

La aplicación del IS es esencial cuando los ensayos involucran la preparación de las muestras donde las eficiencias de extracción son bajas o aquellas que involucran derivatizaciones químicas con rendimientos de reacción bajos.

### *LÍMITE DE DETECCIÓN*

El límite de detección o LOD (por *limit of detection*) de un método analítico es un parámetro importante si las mediciones cuantitativas se realizan a concentraciones cercanas a los LOD. Por lo tanto, es esencial definir el LOD de los métodos para el análisis de trazas de sustancias. La

convenio define al LOD como la concentración que da lugar a una señal que es 3 veces la desviación estándar del blanco (relación señal:ruido S:N de 3:1). En cuanto a la definición de IUPAC “es la menor concentración de analito que puede ser detectada con un cierto nivel de confianza” siendo 3,28 veces la desviación estándar del blanco [163].

### *LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN*

El límite de cuantificación o LOQ (por *limit of quantification*) es la mínima concentración en una muestra que puede ser medida con un nivel de aceptabilidad de precisión y exactitud. Los LOD y LOQ son relevantes sólo en los estudios de trazas en los métodos analíticos cuando las medidas son a concentraciones cercanas a dichos límites. La IUPAC define al LOQ como la concentración que da lugar a una señal, la cual es 10 veces la desviación estándar del blanco (relación señal:ruido S:N de 10:1) [163].

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS**

La combinación de técnicas miniaturizadas de microextracción y limpieza basadas en tensioactivos y de instrumentación de última generación permitirá desarrollar metodologías analíticas simples y eficientes para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes y emergentes como los OP y PBDE en muestras de origen ambiental (agua) y biológico (cabello y leche materna). Estas metodologías permitirán obtener información sobre los niveles de concentración de estos contaminantes en muestras de Mendoza evidenciando exposición de la

población a los mismos. Asimismo, se esperan encontrar contaminantes aún más modernos, como lo son los PFR y sus metabolitos, en muestras abióticas de Argentina aplicando técnicas verdes de análisis. Estos estudios serían un aporte sustancial a la ciencia dado que los mismos no han sido previamente reportados en Argentina en los tipos de muestras estudiadas, con excepción de los OP en muestras de agua.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollo de herramientas analíticas compatibles con el ambiente para la determinación de OP y PBDE en muestras de distintos compartimentos ambientales (agua, cabello y leche materna). Éstas permitirán obtener información sobre los niveles de concentración de estos contaminantes en muestras de Mendoza. Asimismo, se estudiará la presencia y niveles de contaminantes aún más modernos, como lo son los PFR y sus metabolitos, en muestras abióticas de Argentina. Estos estudios permitirán evidenciar la exposición de la población a los mismos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i) Caracterizar los sistemas de microextracción con distintos tipos de fases extractivas (solventes convencionales y no convencionales, tensioactivos, etc.) aplicados a muestras ambientales y biológicas (ej.: agua, nieve y/o hielo glaciar, cabello, leche, entre otras) para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes y emergentes, entre ellos los OP y los PBDE.
- ii) Desarrollar y validar metodologías analíticas eficientes, novedosas y compatibles con el ambiente para la determinación de OP y PBDE en muestras ambientales y biológicas, basadas en las técnicas de microextracción estudiadas en el objetivo i).
- iii) Aplicar las metodologías analíticas desarrolladas para la determinación de OP y PBDE en muestras de interés ambiental y biológico de la provincia de Mendoza (Ej.: agua, nieve, leche humana, cabello, etc.).
- iv) Se estudiará por primera vez en Argentina la presencia y niveles de contaminantes emergentes modernos, como los PFR y sus metabolitos, en muestras de aguas residuales provenientes de plantas de tratamiento de residuos cloacales.
- v) Evaluar las conclusiones obtenidas en el objetivo iii) para proponer este tipo de análisis como herramienta de diagnóstico de ambientes potencialmente afectados.
- vi) Evaluar comparativamente los niveles hallados de los contaminantes persistentes y emergentes estudiados con otras regiones del mundo para estimar (preliminarmente) el grado de exposición de la población considerada.



# **CAPÍTULO II: DETERMINACIÓN DE PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO**

## **Aportes novedosos y destacados del capítulo II:**

- La enzima proteinasa K se usó para digerir cabello humano y liberar a los PBDE de la matriz del cabello.
- El SDS se usó simultáneamente como agente desnaturizante en la etapa de digestión y como agente dispersivo en la etapa de SA-DLLME.
- Los PBDE fueron determinados por primera vez muestras de cabello humano en Argentina.

- Se encontró PBDE en 3 de las 4 muestras analizadas en un rango concentración de 0,01-0,07 ng g<sup>-1</sup>.

**1.1 INT**

**RO**

**DU**

**CCI**

**ÓN**

El uso de muestras humanas es una herramienta ingeniosa para la evaluación de la exposición de la población al medio ambiente [80,164]. Sin embargo, las muestras humanas convencionales (tejido adiposo, sangre) requieren un procedimiento de muestreo invasivo y conduce a inconvenientes éticos y prácticos [88]. Por esta razón, existe un mayor interés en el desarrollo de metodologías de preparación de muestras para determinar PBDE en matrices no invasivas como las muestras de cabello, uñas y orina [165]. Entre las posibles matrices no invasivas, el cabello parece ser una de las matrices más prometedoras para determinar PBDE. Las principales ventajas de usar muestras de cabello son la posibilidad de monitoreo a corto y largo plazo y la estabilidad metabólica que presenta (actividad metabólica baja o nula) [166]. Por lo tanto, una vez que los PBDE se incorporan al tejido queratinoso del cabello, su concentración permanece relativamente sin cambios. Además la preservación de las muestras de cabello humano es más sencilla que la de las muestras biológicas convencionales dado que pueden ser almacenadas eficazmente en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Dado que los PBDE pueden estar presentes en las muestras de cabello humano en concentraciones traza [166], determinarlos requiere metodologías analíticas altamente selectivas y sensibles [167] y la preparación de muestras es la etapa principal de estos procesos.

El cabello es una muestra queratinosa compleja y resistente que requiere una digestión exhaustiva para liberar los PBDE de la matriz antes de la extracción y el análisis. Por lo general, el proceso de digestión del cabello para determinar PBDE se lleva a cabo en medio ácido con HCl o HNO<sub>3</sub> fuerte (1 M aproximadamente) [46,168] o básico con Na(OH) fuerte (1 M) [46] a 40-95 °C y durante toda la noche (hasta por 18 horas) [46,169] para la determinación de PBDE. La digestión ácida o básica requiere el uso de reactivos corrosivos concentrados (HCl, HNO<sub>3</sub>, NaOH, hasta 4 M) para llevar a cabo la digestión del cabello [46,169]. Para el mejor conocimiento

de los autores, no existen informes sobre el uso de la digestión enzimática del cabello para determinar PBDE en muestras de cabello humano. En este sentido, la digestión enzimática (ED) es más leve y menos tóxica que las digestiones convencionales [170].

Además, la solución acuosa obtenida de la etapa ED es adecuada para el acoplamiento con la técnica de microextracción líquido-líquido. La LLME requiere una fase donante acuosa y una fase extractiva inmiscible, que generalmente es un solvente orgánico. Normalmente, la LLE se utiliza para la extracción de PBDE a partir de la digestión ácida o básica de muestras de cabello humano [46,166,171]. Sin embargo, no hay informes sobre la técnica de acoplamiento LLME para tal fin. La técnica LLE requiere grandes cantidades de volúmenes de muestra y solvente orgánico y largos tiempos de extracción, lo que aumenta los riesgos para el operador y la generación de residuos [166]. No hay información en la literatura sobre el acoplamiento de la digestión enzimática junto con técnicas de microextracción verdes para determinar PBDE en muestras de cabello humano. La LLME dispersiva (DLLME) es una técnica de extracción ecológica basada en un sistema ternario de componentes. La DLLME está compuesta por una fase acuosa donante y una mezcla de un solvente extractor y un agente dispersivo, que generalmente son solventes no polares y polares, respectivamente, con una afinidad por los analitos a extraer. El papel del agente dispersivo es disminuir la tensión interfacial entre el solvente no polar y la solución acuosa, lo que conduce a la dispersión de finas microgotas del solvente extractor dentro de la fase acuosa donante. La dispersión conduce a un área de superficie extendida del solvente extractivo, lo que favorece el proceso de transferencia de masa y, en consecuencia, la eficiencia de extracción.

La adición de tensioactivos, como el dodecil sulfato de sodio (SDS) como agente dispersivo en la DLLME ha sido eficaz en la extracción y detección de múltiples compuestos bioactivos, incluidos los cannabinoides [18], fármacos antiepilépticos [19], clorofenoles [20], y fármacos antiarrítmicos [21], entre otros. Esta técnica DLLME se conoce comúnmente como microextracción líquido líquido dispersiva asistida por tensioactivo o SA-DLLME [22].

En este capítulo, se propuso el innovador acoplamiento de ED, SA-DLLME, limpieza y análisis instrumental como una metodología analítica simple, suave y eficiente para determinar PBDE en muestras de cabello humano. Cuatro de los PBDE más comúnmente encontrados en muestras de cabello humano fueron seleccionados como analitos objetivo para el desarrollo analítico: BDE-47, BDE-99, BDE-100 y BDE-153. Se utilizó un método multivariado de Box Behnken para optimizar el efecto de cada variable, así como sus interacciones [23] en la respuesta analítica de los PBDE objetivo. El rendimiento analítico de la metodología propuesta ED-SA-DLLME-GC-ECD se evaluó en términos de límite de detección (LOD), repetibilidad, recuperación (%) y un rango

de trabajo lineal para determinar PBDE en muestras de cabello humano. La metodología propuesta ED-SA-DLLME-GC-ECD se aplicó para analizar cuatro reales.

**1.2 EX**

**PE**

**RIM**

**EN**

**TA**

**L**

### **1.2.1 REACTIVOS Y SOLVENTES**

Los estándares comerciales de PBDE que se utilizaron son: BDE-47, -99, -100 y -153, a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  en isoctano (Accustandard, New Haven, CT, Estados Unidos). Se usó bifenilo de decacloro (PCB -209) como estándar interno a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  en isoctano (Chem-Lab, Zedelgem, Bélgica). Los estándares de PBDE se conservaron en oscuridad y a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las futuras soluciones de PBDE e IS se prepararon en isoctano y por separado, en concentraciones de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  y  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectivamente, y conservadas en viales color caramelo a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se empleó, asimismo, n-hexano ( $\text{C}_6$ , J.T. Baker, Center Valley, PA, EE.UU.), sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sulfato de magnesio DE 99% de pureza ( $\text{MgSO}_4$ ), sílica gel (70-230 mesh), isoctano y tetracloroetileno (Merck, Alemania), éter etílico (EE) y ácido sulfúrico (Sintorgan y Biopack, Argentina, respectivamente), ácido clorhídrico y Tris (Dalton y Anedra, Argentina, respectivamente) usados para la preparación de la solución tampón; dodecil sulfato de sodio de pureza 99% (SDS, Promega, EE.UU.), proteinasa K liofilizada [grado PCR; actividad  $24 \text{ U mg}^{-1}$  de material (caseína  $37^\circ\text{C}$ ) Sigma Aldrich Roche, Alemania]. Ácido peracético 10% (v/v) (MAG, Argentina), agua ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, París, Francia). Para preparar sílica ácida, se añadieron gota a gota, 44 g de ácido sulfúrico a 100 g de sílica anhidra bajo agitación. Todos los reactivos empleados para este trabajo experimental son de grado analítico o superior.

## **1.2.2 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA Y SOFTWARE**

### **CROMATÓGRAFO DE GASES CON DETECCIÓN POR CAPTURA DE ELECTRONES**

La determinación de BDE-47, -99, -100 y -153 en muestras de cabello se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 (Series II) equipado con un detector de captura de electrones (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA) operado a 300 °C. La columna de GC usada es una VF-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espesor de la película; Varian, Lake Forest, CA, EE.UU.). Las inyecciones fueron llevadas a cabo en el modo sin división. Se usó gas nitrógeno 5.0 (99,999%) como gas portador con un flujo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (12 Pa). La temperatura del inyector fue de 250 °C. El programa de temperaturas fue: 90 °C, durante 1 min; rampa 1: 35 °C min<sup>-1</sup> a 250 °C; rampa 2: 20 °C min<sup>-1</sup> a una temperatura final de 280 °C y se mantuvo durante 20 min. La identificación de los picos y la cuantificación se realizó con el IS PCB – 209.

## **1.2.3 MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de cabello humano se colectaron del vértice posterior debido a que el cabello de la parte posterior de la corteza craneal raramente presenta variación en su crecimiento y el número de cabellos en ese área es más constante y se ve menos afectado por las diferencias de edad y sexo. Las muestras de cabello no fueron modificadas químicamente con agentes blanqueadores, ondulación permanente, alisados o coloración mediante tinturas [177]. Las muestras fueron colectadas de 4 voluntarios de Mendoza, Argentina y se almacenaron a 20 °C antes del análisis. Una alícuota de muestra de cabello de 200 mg se descontaminó externamente mediante el lavado con 3 x 3 mL de agua ultrapura y se dejó secar en paños limpios. Luego, el cabello se pulverizó en segmentos de aproximadamente 0,2 mm de largo con máquina para cortar cabello o tijeras. Para los ensayos de optimización, a las alícuotas de 200 mg de muestras de cabello se les agregó la mezcla de PBDE para una concentración final de 25 ng g<sup>-1</sup> de cada BDE. Se utilizó cabello humano a lo largo de toda la metodología analítica para evitar realizar nuevos ajustes en el análisis de muestras reales.

## **1.2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

La preparación de la muestra propuesta implicó una digestión enzimática (ED) y una microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por tensioactivo (SA-DLLME) que se detalla a continuación: en la etapa de ED, se agregó una alícuota de 200 mg de muestra de cabello humano en un tubo de vidrio para centrífuga de 10 mL junto con 5 mL de ácido peracético 10 % (v/v). La solución se mezcló en un agitador lineal termostático (utilizando un baño termostático por encima del agitador) a 500 rpm, 40 °C durante una hora. La fase acuosa resultante se descartó y se lavó el cabello con 3 x 3 mL de agua ultrapura. Al cabello lavado se le agregaron

0,5 mL de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8, 30  $\mu\text{L}$  de proteinasa K 240 U  $\text{mL}^{-1}$ , 500  $\mu\text{L}$  de SDS 10 % (p/v) y se llevó a 5 mL con agua ultrapura. Luego, la mezcla se homogeneizó usando un agitador lineal termostático a 500 rpm, 37°C durante 60 min. A la solución homogénea obtenida se le agregó 1 mg de sulfato de magnesio, 50  $\mu\text{L}$  de tetracloroetileno ( $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ) y se la llevó a 10 mL agitando manualmente durante 1 min hasta observar la formación de las microgotas. La solución turbia resultante se centrifugó a 2000 rpm (350 x g) durante 5 min para acelerar la separación de fases. La fase acuosa superior resultante fue descartada manteniendo la fase orgánica inferior que contenía a los PBDE. A la fase orgánica obtenida se le realizó una limpieza usando un cartucho de 5 mL que contenía (de abajo hacia arriba) 0,2 g de sílica activada, 0,8 g de sílica acidificada y 0,2 g de sulfato de sodio anhidro. El sorbente fue activado con 3 x 2 mL de n-hexano. La fase orgánica fue sembrada en el cartucho y a continuación los cartuchos se secaron al vacío en un dispositivo de SPE conectado a bomba durante 15 min. A continuación, los PBDE fueron eluidos con 3 x 3 mL n-hexano:éter etílico 1:1 (v/v). El extracto fue luego evaporado hasta aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ , usando una corriente suave de nitrógeno a 34–35 °C. De la fase orgánica resultante se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el GC-ECD para análisis. La **Figura 4** muestra el esquema de la metodología analítica desarrollada.

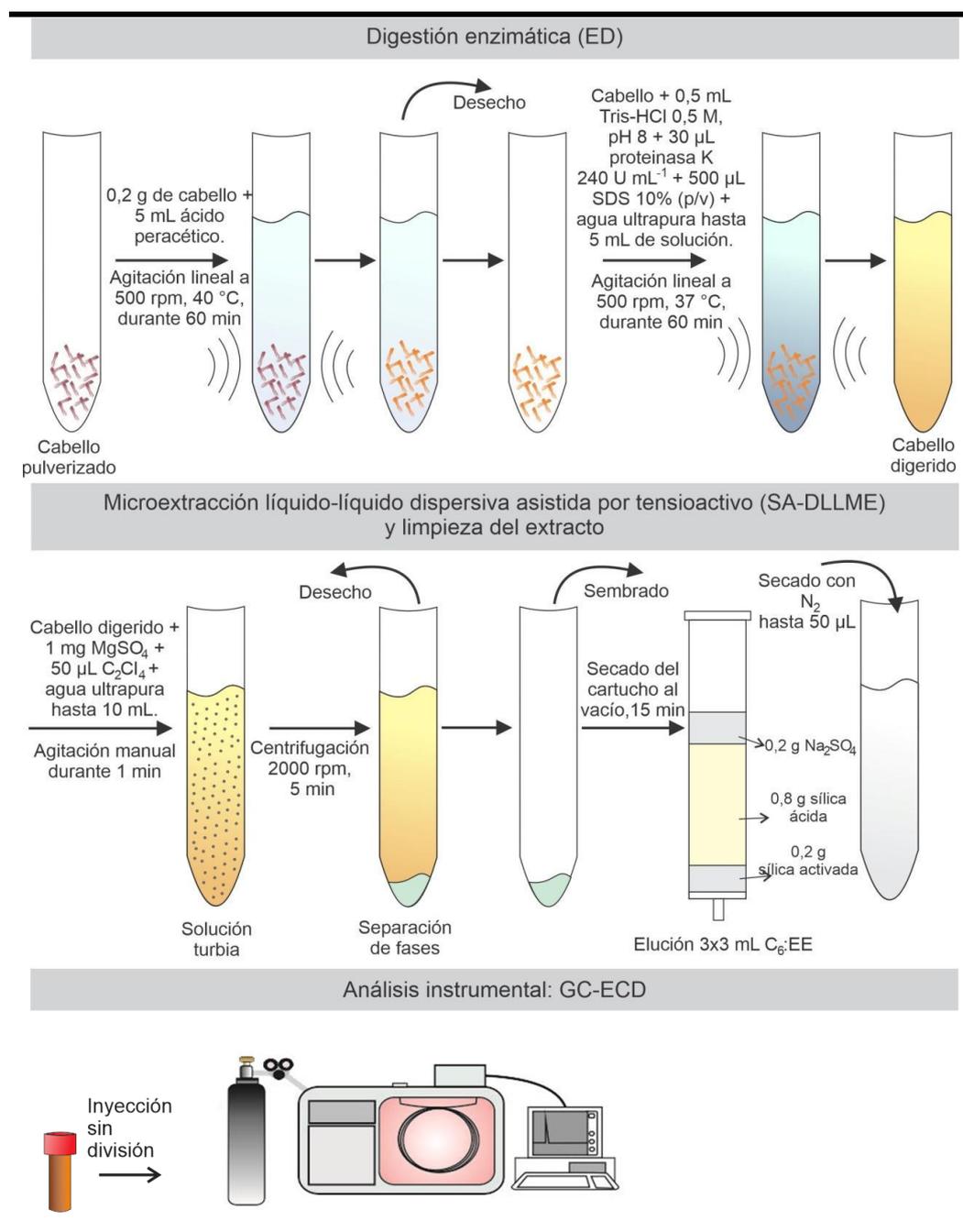


Figura 4. Esquema de los pasos de la metodología analítica desarrollada para la determinación de PBDE mediante ED-SA-DLLME-GC-ECD.

### 1.2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Se usó el software Stat-Ease Design-Expert trial versión 7.0.0 para el diseño experimental y el análisis de los datos. La optimización de la técnica de digestión y de extracción fue estudiada conjuntamente debido a que las variables de ambas técnicas están estrechamente relacionadas. En este caso, se utilizó un diseño experimental factorial fraccionado ( $2^{k-3}$ ) para evaluar la importancia de las variables presentes en el sistema, así como las interacciones que gobiernan la metodología. Se utilizaron las gráficas de Pareto luego de la regresión lineal múltiple y el

análisis de la varianza, para seleccionar las variables significativas del sistema [176]. Una vez seleccionadas las variables, se realizó un BBD para identificar las condiciones que condujeran a las respuestas analíticas óptimas de los PBDE y para predecir matemáticamente cómo las respuestas analíticas se relacionaron con los valores de las variables de trabajo [178]. Los valores atípicos se eliminaron mediante el análisis de la diferencia entre prueba de valores ajustados o DFFITS (del inglés *difference in fits*), debido a su influencia desproporcionada en la respuesta prevista, y por lo tanto en el modelo [176]. De este modo, la línea de corte del DFFITS se define como  $2\sqrt{p/n}$ , donde  $p$  y  $n$  se refieren respectivamente al número de coeficientes de regresión y el tamaño de la muestra. Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple y se validaron mediante el análisis de la varianza. Finalmente, se utilizó un criterio de respuesta múltiple, la función de deseabilidad (D), para encontrar los valores que conducen a la mejor respuesta analítica para los PBDE estudiados en esta sección [179].

### **1.2.6 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD ANALÍTICA/CONTROL DE CALIDAD**

Se analizaron 3 blancos de procedimiento cada 10 muestras de cabello humano. Los blancos de procedimiento fueron consistentes entre ellos obteniendo un RSD < 1,3%. Los límites de detección y cuantificación del método se fijaron según IUPAC. Para los compuestos no detectados en los blancos, los LOQ se calcularon en base a la sensibilidad del sistema de la relación S/N (señal:ruido) de 10. El aseguramiento de la calidad instrumental también incluyó la inyección de blancos de solvente (C<sub>6</sub>:EE 1:1, v/v) con IS cada 5 muestras de cabello y luego de las inyecciones de los blancos de procedimiento.

Las hebras de cabello pueden incorporar PBDE del torrente sanguíneo (contaminación endógena) y adsorberlos del medio ambiente (contaminación exógena) <sup>[10]</sup>. Muchos factores, como la edad, el sexo y el color del cabello, pueden afectar la incorporación de PBDE en el cabello <sup>[24]</sup>. La acumulación de PBDE en los mechones de cabello se atribuye a su capacidad de unión a proteínas en lugar de su lipoficidad <sup>[25]</sup>. Para determinar la contaminación endógena de los PBDE, es necesario liberar los PBDE de las hebras del cabello mediante la aplicación de una técnica de digestión antes de la técnica SA-DLLME.

En este capítulo, la metodología propuesta ED-SA-DLLME fue diseñada, estudiada y optimizada para determinar PBDE endógenos en muestras de cabello humano. La eficiencia de la metodología ED-SA-DLLME está condicionada por el proceso de transferencia de masa <sup>[20]</sup> durante las etapas de digestión y microextracción. Sin embargo, otros factores como la disponibilidad de los analitos, las interferencias de la matriz y la compatibilidad entre etapas también tienen un efecto en la eficiencia de la metodología. Se propuso un enfoque estadístico multivariado para identificar y optimizar las variables relevantes y sus interacciones, lo que condicionó significativamente la metodología de preparación de muestras. Todos los ensayos

analíticos se llevaron a cabo en muestras reales y previamente se verificó que estuviesen libres de PBDE utilizando una metodología tradicional [15].

### **1.3.1 ESCISIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DE LA QUERATINA**

Previo a la digestión enzimática, la escisión o disociación de los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína debe realizarse por dos motivos: a) para permitir la separación de las cadenas de los polipéptidos y b) para evitar que las proteínas restablezcan su conformación nativa, lo que dificulta la acción de agentes enzimáticos [181].

El cabello humano es una matriz compleja queratinosa con un alto contenido de proteínas (aproximadamente 88%) y con un contenido lipídico en el rango de 3-4% [46]. La queratina representa un grupo de proteínas insolubles, generalmente con alto contenido de azufre y formadoras de filamentos [182]. La cisteína y su forma oxidada, la cistina, son aminoácidos que contienen azufre y que se caracterizan por su baja polaridad. La cisteína juega un rol importante en la estabilidad de la estructura de la proteína, ya que puede participar en la formación de un enlace disulfuro con otro residuo de cisteína para formar los residuos de cistina [183]. Por lo tanto, es necesario disociar los enlaces disulfuro con otros residuos antes de la etapa de digestión enzimática. En este sentido, se informa que la disociación se lleva a cabo con ditioneitol [184,185], mercaptoetanol [184] y ácido peracético [186], entre otros. Los primeros dos tratamientos disocian los enlaces disulfuro pero son difíciles de llevar a cabo ya que implican la formación de emulsiones [168] que comprometerían la separación de fases en la etapa de DLLME. De lo contrario, la oxidación con ácido peracético convierte todos los residuos de cisteína en ácido cisteico evitando la formación de emulsiones [186]. Por lo tanto, basado en un procedimiento realizado por Guzman y colaboradores [186] en este trabajo se utilizó: 200 mg de cabello humano, 5 mL de ácido peracético 10 % (v/v) a 40 °C durante 60 min para escindir los puentes disulfuro. Luego de escindir los puentes disulfuro, es necesario realizar una etapa de digestión para digerir el cabello completamente y lograr la liberación de los PBDE desde la matriz.

### **1.3.2 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA ASISTIDA POR TENSIOACTIVO**

La ED puede ser llevada a cabo con enzimas no específicas como la proteinasa K, la cual es una proteasa serina relacionada con la subtilisina y digiere proteínas nativas. Hay reportes en la literatura sobre el uso de agentes desnaturizantes como el tensioactivo SDS [184,185] y la urea [168,181] que estimulan la actividad de la proteinasa K. Por otro lado, la proteinasa K es estable en el rango de valores de pH entre 4 y 12,5 y puede mantener su completa actividad durante varias horas cuando se la utiliza en un rango de valores de pH entre 6,5 y 9,5. La enzima es 12 veces más activa a 65 °C que a 25 °C, sin embargo, se desnaturaliza rápidamente a temperaturas

por encima de 65 °C. La solución acuosa homogenizada resultante de la etapa de digestión enzimática (homogenato) es apropiada para aplicar la técnica de SA-DLLME. En esta técnica, sólo entre 50 y 200 µL de solvente extractivo y solvente dispersivo es requerido para extraer analitos de muestras acuosas, en lugar de los 10 a 100 mL que necesita la LLE tradicional [95]. En este sentido, la selección de los solventes extractivo y dispersivo son importantes para la extracción eficiente de los PBDE en la técnica de SA-DLLME. Considerando las propiedades fisicoquímicas de los solventes dispersivos (solubilidad tanto en la fase orgánica como en la acuosa y afinidad con los PBDE) se propuso al tensioactivo SDS como agente dispersivo. El SDS no sólo satisface los requerimientos previamente mencionados, sino que además es menos tóxico que los solventes dispersivos tradicionales (acetona, acetonitrilo, metanol) y no debe agregarse nuevamente en la solución, ya que forma parte del sistema extractivo desde la etapa de digestión enzimática.

Zhang y colaboradores (2013) reportaron el uso de diferentes solventes extractivos tales como el tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono, triclorometano, tetracloroetileno y clorobenceno para extraer PBDE de soluciones acuosas [187]. El mayor porcentaje de recuperación de los PBDE lo obtuvieron con tetracloroetileno. Por consiguiente, es necesario optimizar todas las variables que influyen en las técnicas de ED y SA-DLLME para lograr la máxima eficiencia de la digestión del cabello y la extracción de los PBDE. Las técnicas de ED y SA-DLLME se optimizaron juntas dado que la solución acuosa obtenida de la etapa de ED se usó luego como fase dadora de PBDE en la etapa de SA-DLLME y el SDS utilizado como agente desnaturizante en la etapa de ED es luego el solvente dispersivo en la etapa de SA-DLLME.

Para seleccionar las variables que condicionan la eficiencia de las etapas de ED y SA-DLLME se realizó un escaneo inicial usando diseño factorial fraccionado ( $2^{k-3}$ ) bajo las siguientes condiciones: concentración de proteinasa K (0,72-1,44 U mL<sup>-1</sup>), concentración de SDS (0,5-1% p/v), pH de la digestión (6,5-9,5, buffer Tris HCl 0,5 M) tiempo y temperatura de trabajo necesaria para la digestión (120-180 min, y 37-60°C, respectivamente), volumen final de la solución dadora (5-10 mL), efecto salino (Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0-4 mg mL<sup>-1</sup>), volumen de solvente extractivo (tetracloroetileno, 50-200 µL) y temperatura de trabajo necesaria para la extracción (0-15 min, y 4-40 °C, respectivamente). El diseño constó de 136 ensayos con 8 bloques y 1 punto central por bloque.

Las condiciones de trabajo están resumidas en la **Tabla 9**. Las gráficas de Pareto (**Figura 5**) muestran las variables individuales y sus interacciones con significancia en la respuesta analítica ( $p < 0,1$ ) de los PBDE estudiados. Las variables significativas resultantes fueron la concentración de proteinasa K, la concentración de SDS, el tiempo y temperatura de digestión, el volumen de solvente extractivo y las interacciones entre estas variables. El volumen de solución homogenato,

el pH de la digestión, el efecto salino y el tiempo y la temperatura de extracción no mostraron ser significantes en el rango de niveles estudiados.

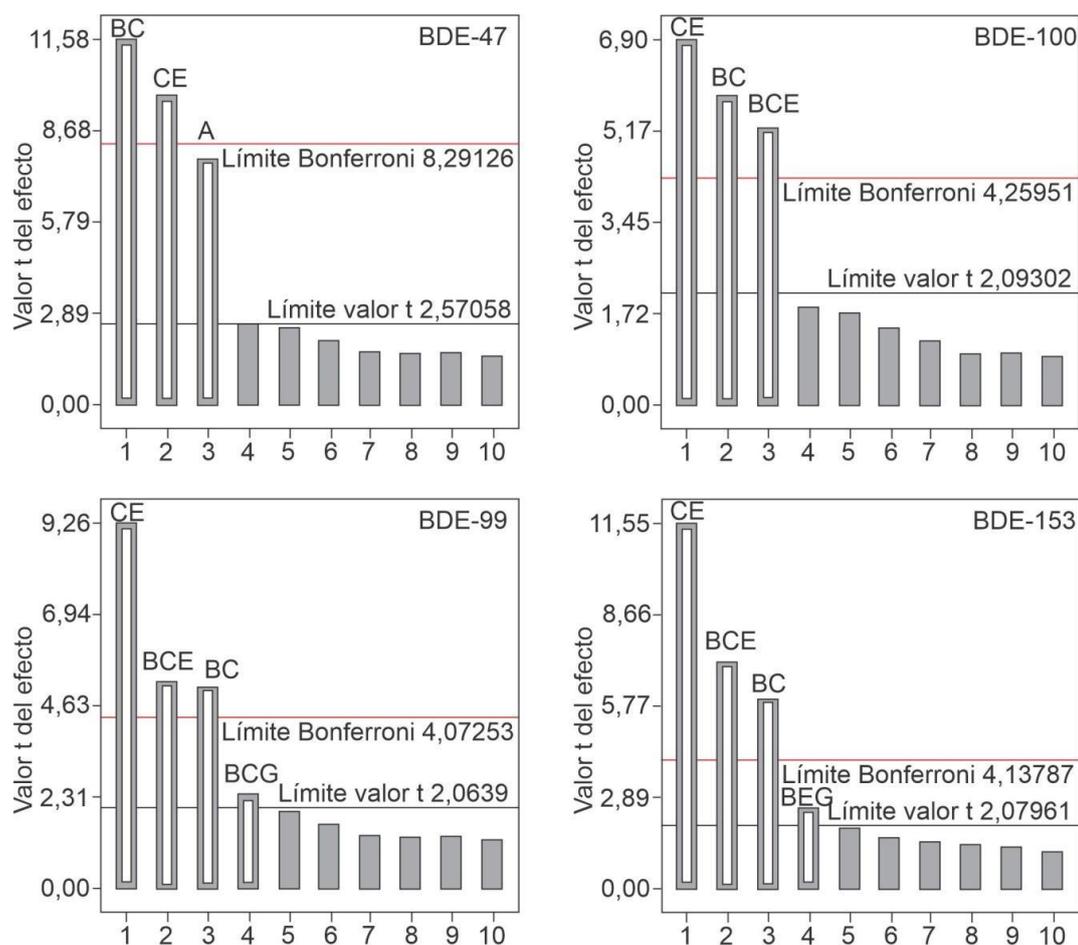


Figura 5. Gráficas de Pareto del estudio de ED-SA-DLLME. Las variables y sus niveles están detallados en la tabla 9.

Tabla 9. Variables y niveles (valores) evaluados en el diseño experimental factorial fraccionado de la ED-SA-DLLME

Variable	Valor mínimo	Valor máximo
<b>A</b> Concentración de Proteinasa K [U mL <sup>-1</sup> ]	0,72	1,44
<b>B</b> Concentración de SDS [% p/v]	0,5	1
<b>C</b> Tiempo de digestión [min]	120	180
<b>D</b> Valor de pH	6,5	9,5
<b>E</b> Temperatura de digestión [°C]	37	60
<b>F</b> Volumen final de solución [mL]	5	10
<b>G</b> Volumen de solvente [µL]	50	200
<b>H</b> Efecto salino [% p/v]	0	4
<b>I</b> Tiempo de extracción [min]	0	15
<b>J</b> Temperatura de extracción [°C]	4	40

Una vez seleccionadas las variables que son significativas en el diseño, se debe pasar a la etapa de optimización de dichas variables. La optimización usando BBD se llevó a cabo considerando las condiciones mostradas en la **tabla 10**. El BBD involucró un total de 46 ensayos con 3 puntos centrales por bloque, considerando las siguientes condiciones: concentración de proteinasa K (0,96-1,92 U mL<sup>-1</sup>), concentración de SDS (0,5-1% p/v), tiempo y temperatura de digestión (60-180 min y 37-60 °C, respectivamente), y volumen de solvente extractivo (5-200 µL). Las variables fueron mejor explicadas con un modelo cuadrático para los PBDE analizados. La **Tabla 10** muestra los parámetros estadísticos correspondientes al ajuste para la resolución. Como se puede observar, los modelos fueron significantes ( $p < 0,05$ ) y sus faltas de ajuste fueron no significantes ( $p > 0,05$ ). Los valores de  $p$  con un 95% de nivel de confianza, muestran que la concentración de proteinasa K, la concentración de SDS, el tiempo y temperatura de digestión y el volumen del solvente extractivo condicionan la eficiencia de la extracción de los PBDE estudiados y, por lo tanto, su respuesta analítica.

Tabla 10. Diseño Box Behnken para ED-SA-DLLME

Variable	Niveles			
	Mínimo			Máximo
<b>A</b> Concentración de Proteinasa K [U mL <sup>-1</sup> ]	0,96			1,92
<b>B</b> Concentración de SDS [% p/v]	0,5			1
<b>C</b> Tiempo de digestión [min]	60			180
<b>D</b> Temperatura de digestión [°C]	37			60
<b>E</b> Volumen de solvente extractivo [µL]	50			200
<b>Valores estadísticos obtenidos para los modelos seleccionados</b>				
	<b>BDE-47</b>	<b>BDE-100</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>
<b>Modelo</b>	Cuadrático			
<b>Transformació</b>	Log natural (lambda 0)			
<b>n</b>				
	<b>Valor <math>p^{30}</math></b>			
<b>Modelo</b>	<b>0.0015</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0024</b>	<b>0.0003</b>
<b>Falta de ajuste</b>	<b>0.1060</b>	<b>0.5866</b>	<b>0.8544</b>	<b>0.8476</b>
<b>I</b>	0.7334	0.9460	0.8221	0.3726
<b>II</b>	<b>0.0099</b>	0.9230	0.7817	0.3638
<b>III</b>	0.8264	0.8663	0.6384	0.3795
<b>IV</b>	0.1065	0.2294	0.2208	0.1710
<b>V</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>III-V</b>	<b>0.0067</b>	<b>0.0491</b>	0.2699	0.1687
<b>II<sup>2</sup></b>	0.0764	<b>0.0201</b>	<b>0.0447</b>	<b>0.0021</b>

<sup>30</sup> Se considera significativo cuando  $p < 0,05$  para el modelo y no significativo cuando  $p > 0,05$  para la falta de ajuste.

IV <sup>2</sup>	0.0988	0.1719	0.1284	<b>0.0144</b>
V <sup>2</sup>	<b>0.0044</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0004</b>

Las condiciones experimentales óptimas que condujeron al máximo (más intenso) en la función D (**Figura 6.A:** D=0,907, **Figura 6.B,** D=0,899, **Figura 6.C,** D=0,918 y **Figura 6.D,** D=0,998) fueron: Proteinasa K 0,96 U mL<sup>-1</sup>, SDS 1% (p/v), 37 °C durante 60 minutos como tiempo y temperatura de digestión y 50 µL de tetracloroetileno como disolvente de extracción. El tiempo y la temperatura de la digestión condicionaron la cinética del proceso ED [188] mejorando el rendimiento de la metodología ED-SA-DLLME.

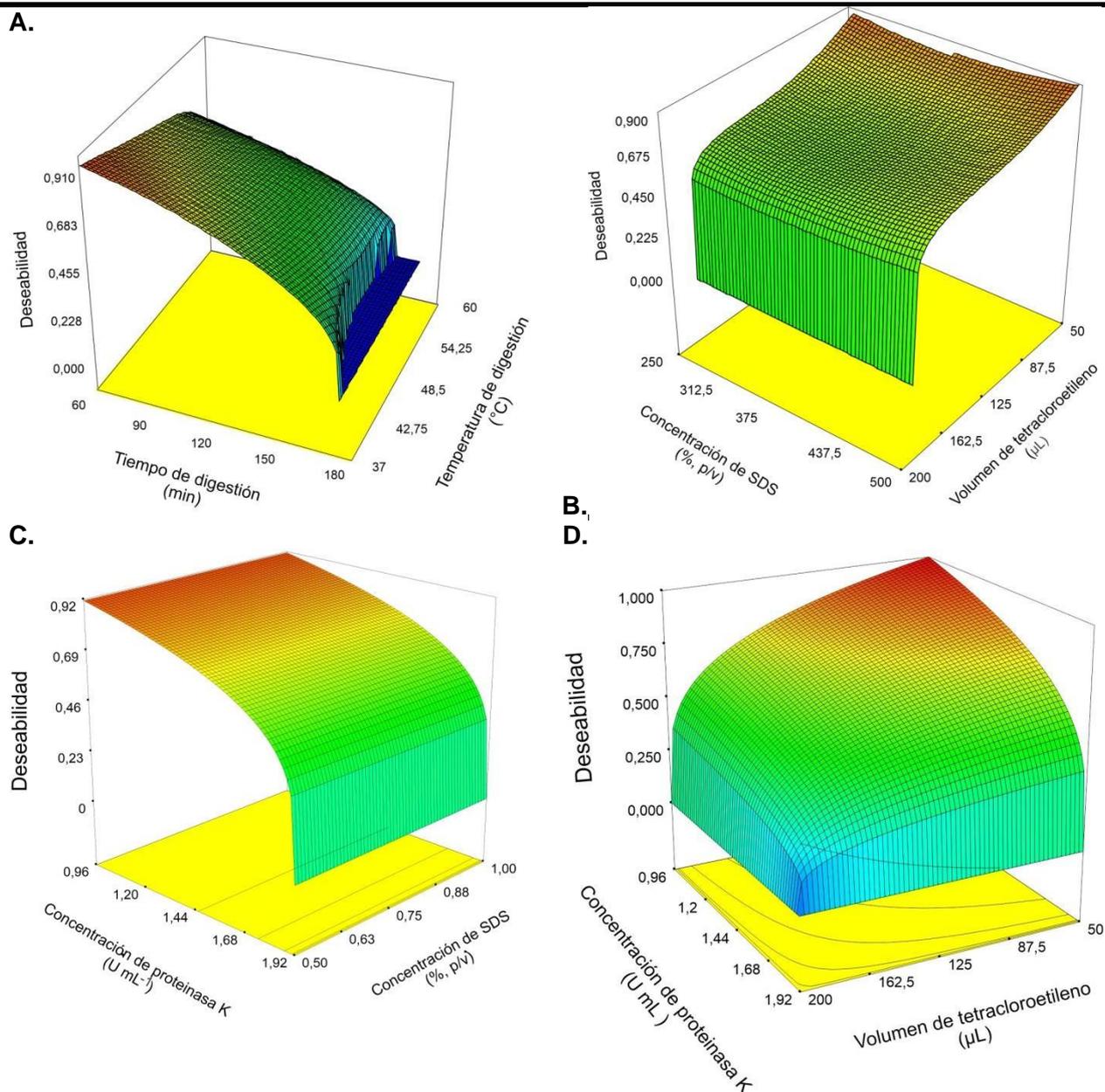


Figura 6. Gráficas de deseabilidad de la respuesta analítica usando BBD obtenida por trazado de A) temperatura de digestión (°C) vs. tiempo de digestión (min), B) concentración de SDS (% v/p) vs. volumen de solvente extractivo [µL] y C) volumen de solvente extractivo [µL] vs. Concentración de

*proteínasa K [U mL<sup>-1</sup>]*

El SDS redujo la tensión interfacial entre las fases acuosa y orgánica mejorando la dispersión del disolvente de extracción en la muestra. Un exceso de concentración de SDS provocaría la formación de micelas y, por lo tanto, una fracción de los PBDE se incorporaría a ellas, reduciendo la eficiencia de extracción del solvente orgánico [147]. El volumen del solvente de extracción, la concentración de SDS y el volumen de la solución dadora (efecto de dilución) afectaron la eficiencia de extracción de los PBDE y, por lo tanto, sus respuestas analíticas.

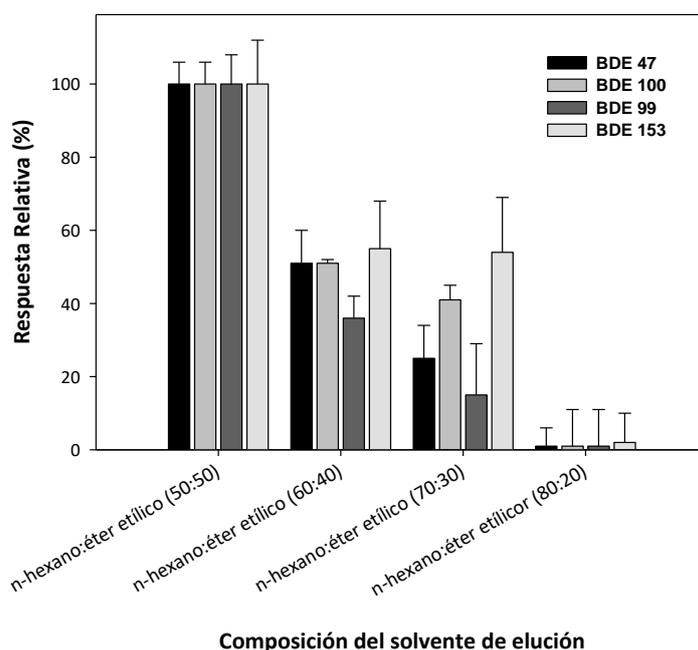
Respecto a los resultados obtenidos en esta sección, se utilizaron para los siguientes experimentos: técnica ED: 0,5 mL pH 8 buffer Tris HCl 0,5 M, 30  $\mu$ L proteínasa K 240 U mL<sup>-1</sup>, 0,5 mL SDS 10% (p/v) en un agitador lineal durante 60 min a 37 °C; y en la técnica de SA-DLLME, 10 mL de solución dadora, 1 mg de sulfato de magnesio y 50  $\mu$ L de tetracloroetileno.

### **1.3.3 EFECTO DEL TIPO Y COMPOSICIÓN DEL SOLVENTE DE ELUCIÓN EN LA LIMPIEZA DEL EXTRACTO**

El detector ECD es uno de los detectores que más sufren de la contaminación y se ven adversamente afectados por el oxígeno y el agua [189] y, a su vez, por los solventes halogenados. La evidencia de la contaminación en el ECD se puede observar usualmente en el ruido de la línea de base, en los picos que tienen pequeñas caídas negativas antes y después de los picos [190] y en el amplio frente de solvente que se observa en los cromatogramas. Por otro lado, el GC también pueden verse afectados por la contaminación. La inyección de muestras reales (sucias) puede contaminar la lana de vidrio del *liner* provocando “picos fantasmas” en los cromatogramas [190]. Asimismo, tanto los analitos como los interferentes de la matriz y el solvente en el que se encuentran, deben ser volátiles para no contaminar la entrada al inyector y la columna capilar [190,191]. Estas condiciones deben cumplirse, o al menos se deben realizar limpiezas exhaustivas del GC-ECD para evitar que el equipo se dañe.

Por tal motivo, se realizó una etapa de limpieza después de la metodología de preparación de muestras ED-SA-DLLME para eliminar tanto el solvente de extracción halogenado (tetracloroetileno), como así también restos de materia orgánica, agua y SDS que podrían quedar de los pasos anteriores. El uso de sorbentes para este propósito es ampliamente reportado y descrito en la literatura. Se puede utilizar en la purificación de los extractos obtenidos de las técnicas de LLE la sílice acidificada en combinación con sílice activada (sílice lavada con n-hexano y calentada a 100°C para eliminar trazas de agua), Florisil® o alúmina [192]. En base a esta consideración, se utilizó sílice acidificada con sílice activada y sulfato de sodio anhidro para preparar el sorbente de limpieza multicapa.

La elución con diclorometano (DCM), n-hexano (C<sub>6</sub>), éter etílico (EE) y mezclas de ellos [92] se usan comúnmente para eluir los PBDE de los cartuchos de limpieza. Sin embargo, DCM representa un inconveniente debido a su incompatibilidad con ECD. En consecuencia, se estudiaron diferentes composiciones de n-hexano y éter etílico para obtener la máxima respuesta analítica de los PBDE. Se ensayaron cuatro composiciones de solvente de elución de la siguiente manera: n-hexano:éter etílico 50:50, 60:40, 70:30 y 80:20 (v/v). La **Figura 7** muestra la respuesta relativa (%) de cada BDE en diferentes composiciones de solventes de elución. Se observó que la respuesta relativa más alta para los PBDE se logró en la composición de C<sub>6</sub>:EE 50:50 (v/v).



*Figura 7. Respuesta relativa (%) de los PBDE frente a la composición de solventes de elución en la etapa de limpieza del extracto.*

#### 1.4 RENDIMIENTO ANALÍTICO Y APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

Las figuras de mérito analítico de la metodología propuesta se encuentran resumidas en la **Tabla 11**. La cuantificación de los PBDE por GC-ECD se realizó usando una curva de calibración externa [162] utilizando CB-209 como IS. Las curvas de calibración se obtuvieron usando un ajuste lineal las cuales mostraron coeficientes de correlación (r) mayores a 0,940. En la **Tabla 11** se exponen las curvas correspondientes a cada BDE. Las curvas exhibieron linealidad entre los rangos de concentración de 0,0034-50 ng g<sup>-1</sup>, 0,006-50 ng g<sup>-1</sup>, 0,01-50 ng g<sup>-1</sup> y 0,043-50 ng g<sup>-1</sup> para BDE-47, -100, -99 y -153, respectivamente y se construyeron usando 5 puntos dentro del rango mencionado, considerando los niveles de PBDE reportados en este tipo de muestras

[16,166,193]. La precisión de la metodología se evaluó mediante la RSD de 5 muestras con agregado de  $1 \text{ ng g}^{-1}$  de estándar de PBDE, obteniendo valores de RSD <9%.

A fin de validar la metodología analítica, se llevó a cabo el estudio de recuperación de los PBDE a 2 niveles de concentración diferentes ( $1 \text{ ng g}^{-1}$  o  $25 \text{ ng g}^{-1}$ ) en las muestras de cabello humano. La **Tabla 12** resume el estudio de recuperación de PBDE en muestras reales de cabello humano. Los PBDE fueron detectados en 3 muestras de cabello humano en un rango de concentración entre  $0,01\text{-}0,07 \text{ ng g}^{-1}$ . Los datos demostraron una correspondencia satisfactoria entre las muestras con agregado de estándar y los niveles base. En la **Figura 8** se observa A) un cromatograma de muestra de cabello con agregado de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  de cada BDE y B) un cromatograma sin agregado de estándar.

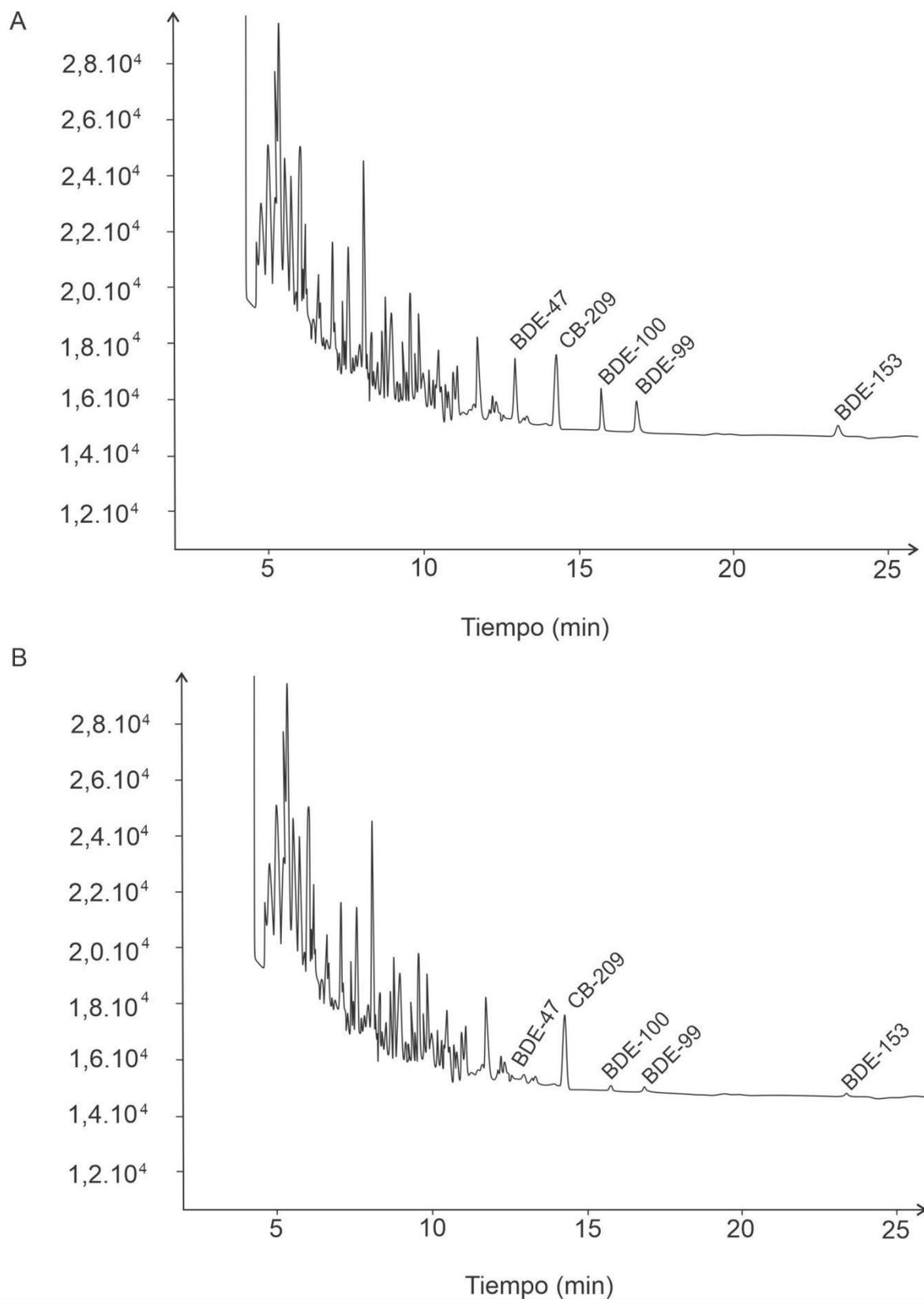


Figura 8. Cromatograma GC-ECD de una muestra de cabello A) con agregado de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  de PBDE e IS y B) sin agregado de PBDE pero con IS. Las condiciones metodológicas están descritas en la sección 2.2.4.

Tabla 11. Figuras de mérito analítico de la metodología ED-SA-DLLME-GC-ECD para determinar PBDE en muestras de cabello humano.

	<b>BDE-47</b>	<b>BDE-100</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>
<b>LOD [pg g<sup>-1</sup>]</b>	1,1	1,8	3,3	14
<b>RL<sup>31</sup> [ng g<sup>-1</sup>]</b>	0,003-50	0,006-50	0,01-50	0,043-50
<b>Coef. R</b>	0,940	0,983	0,970	0,996
<b>RSD [%]</b>	2,57	5,88	7,03	8,49
<b>Recuperación [%]</b>	91	90	90	87
<b>Curva de calibración [ng g<sup>-1</sup>]</b>	y=2921x-18121	y=1046x-2597	y=568,8x-2622	y=230,8x+234,5

	<b>Agregado [ng g<sup>-1</sup>]</b>	<b>Encontrado [ng g<sup>-1</sup>]</b>		
		<b>1</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>BDE-47</b>	<b>Precisión intra-día</b>	0,93±0,21	20,0±0,86	45,0±15,6
<b>BDE-100</b>		1,06±0,19	20,0±0,87	46,1±21,8
<b>BDE-99</b>		0,97±0,22	20,2±2,17	44,8±13,5
<b>BDE-153</b>		0,92±0,31	20,3±2,49	43,5±11,5
<b>BDE-47</b>	<b>Precisión inter-día</b>	0,88±0,19	23,4±3,38	45,1±10,1
<b>BDE-100</b>		0,87±0,17	23,4±5,30	45,1±12,2
<b>BDE-99</b>		0,98±0,23	23,3±3,48	44,3±11,1

<sup>31</sup> RL: rango lineal

**BDE-153**

0,96±0,23

22,1±3,70

42,9±11,4

Tabla 12. Estudio de la recuperación y aplicación a muestras reales de la metodología ED-SA-DLLME-GC-ECD para determinar PBDE en muestras de cabello humano.

Cabello humano	Encontrado [ng g <sup>-1</sup> ]	1 ng g <sup>-1</sup> agregado		25 ng g <sup>-1</sup> agregado	
		Encontrado [ng g <sup>-1</sup> ] <sup>32</sup>	Recuperación [%] <sup>33</sup>	Encontrado [ng g <sup>-1</sup> ]	Recuperación n [%]
<b>Muestra 1</b>					
BDE-47	0,06±0,005	0,93±0,19	87	21,0±2,74	84
BDE-100	0,07±0,013	1,02±0,06	95	22,4±1,30	89
BDE-99	0,05±0,003	0,99±0,03	95	24,9±0,69	99
BDE-153	0,07±0,004	1,06±0,09	99	23,7±0,61	95
<b>Muestra 2</b>					
BDE-47	0,01±0,001	1,07±0,27	106	25,2±6,35	101
BDE-100	0,04±0,002	0,95±0,23	95	22,7±2,55	91
BDE-99	0,05±0,010	1,00±0,43	100	22,7±3,73	91
BDE-153	0,07±0,020	0,96±0,17	96	22,3±2,08	89
<b>Muestra 3</b>					
BDE-47	0,01±0,003	0,88±0,31	87	25,0±3,73	100
BDE-100	0,01±0,001	0,83±0,27	82	21,8±11,4	87
BDE-99	0,03±0,001	0,97±0,35	94	24,0±3,50	96
BDE-153	<LOQ	0,88±0,42	84	22,5±9,69	90
<b>Muestra 4</b>					
BDE-47	<LOQ	0,93±0,21	93	23,1±0,86	80
BDE-100	<LOQ	1,00±0,19	100	24,0±0,87	80
BDE-99	<LOQ	0,97±0,22	97	20,2±2,17	81
BDE-153	<LOQ	0,92±0,31	92	20,3±2,49	81

## 1.5 COMPARACIÓN DE LA ED-SA-DLLME-GC-ECD CON OTRAS METODOLOGÍAS

### ANALÍTICAS PARA DETERMINAR PBDE EN MUESTRAS DE CABELLO HUMANO

La metodología propuesta ED-SA-DLLME-GC-ECD para determinar cuatro PBDE en muestras de cabello humano presentó varias características que la hacen adecuada para el

<sup>32</sup> 95% intervalo de confianza; n=3. Resultados expresados como la media±SD. Las condiciones de extracción son las descritas en la sección 2.2.4.

<sup>33</sup> Estudio de recuperación= [(Encontrado-base)/agregado]x100

análisis de rutina. La **Tabla 13** resume las metodologías analíticas informadas en la literatura para determinar PBDE en muestras de cabello humano. Las cifras analíticas de mérito de la metodología desarrollada (rango lineal, RSD (%), recuperación (%), LOD y LOQ) fueron comparables a las reportadas previamente. En la metodología ED-SA-DLLME-GC-ECD, ED se destaca sobre las técnicas de digestión convencionales debido a su tiempo de digestión más corto (60 min frente a más de 12 h), su temperatura más baja de acción enzimática (37 °C versus 45-90 °C) pero, sobre todo, el hecho de que es ecológica, ya que no requiere reactivos corrosivos. La técnica SA-DLLME utiliza volúmenes más pequeños de solvente orgánico que las técnicas convencionales de LLE reportadas en la **Tabla 13** (50 µL en lugar de mililitros) y reemplaza el uso de solventes dispersivos polares por el uso del tensioactivo SDS. Asimismo, la **Tabla 13** muestra que la masa de sorbente de las etapas de limpieza de las metodologías citadas es un orden de magnitud más que la propuesta en este trabajo.

Tabla 13. Comparación con otras metodologías analíticas para determinar PBDE en muestras de cabello humano

Técnica instrumenta l	Muestr a [g]	Pre-tratamiento	Técnica de digestión	Técnica de extracción	Técnica de limpieza	PBDE	Ref <sup>34</sup>
GC-MS- ECNI	0,3-0,5	Agua milli-Q 1 h, 40°C	4 mL HCl 4 M y 3 mL C <sub>6</sub> :DCM 4:1 v/v a 40 °C toda la noche	LLE: 2x4 mL C <sub>6</sub> :DCM 4:1 v/v	2 g sílica ác. 44% p/p. Elusión: 4 mL C <sub>6</sub> .	-28, -47, -99, -100, - 153, -154, -183	[171]
GC-MS	0,2	Agua desionizada tibia y shampoo	1) 3 mL HCl 3 N 40 °C toda la noche 2) 3 mL NaOH 2,5 M, 40 °C toda la noche	LLE: 4 x 2 mL C <sub>6</sub>	2 g Florisil®, 1 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> arriba. Elusión: 12 mL C <sub>6</sub> :AE (4:1, v/v)	-17, -28, -47, -66, - 71, -85, -99, -100, - 138, -153, -154, - 183, -190, -209	[46]
GC-MS	0,1	-	HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1:1 v/v 2 h 60 °C + 10 mL agua milli-Q	LLE: 3x10 mL C <sub>6</sub> :DCM 4:1 v/v	Evaporar a 1 mL + 25 mL de C <sub>6</sub> . 6 g Florisil®. Elusión: 35 mL C <sub>6</sub> y 40 mL C <sub>6</sub> :DCM 1:1 v/v	-28, -47, -99, -100, - 153, -154, -209	[16]
GC-ECD	0,2	5 mL ácido peracético, 60 min 40°C	Proteinasa K 9,6 U + 1% p/v SDS, 60 min a 37°C	SA-DLLME: 50 µL tetracloroetileno	0,2 g sílica + 0,8 g sílica ác. 44% p/p + 0,2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Elusión: 3x3 mL C <sub>6</sub> :EE 1:1 v/v	-47, -100, -99, -153	actua l

<sup>34</sup> Ref: referencia

## 1.6 CONCLUSIONES PARCIALES

La metodología analítica propuesta, ED-SA-DLLME-GC-ECD, ha demostrado ser un enfoque eficaz para determinar PBDE en muestras de cabello humano y adecuada para aplicaciones del mundo real. Bajo las condiciones de trabajo optimizadas, los LOD y LOQ se encontraron en el orden de picogramos por gramo. El estudio de recuperación demostró la eficiencia para extraer y cuantificar PBDE en muestras de cabello humano.

La metodología de preparación de muestras ED-SA-DLLME introduce un enfoque más ecológico a las metodologías clásicas. En este sentido, la técnica de ED conduce a reducir el tiempo y la temperatura de la digestión y el consumo de energía; y reemplazar reactivos corrosivos por el uso de enzimas. La técnica SA-DLLME reduce el volumen de extracción del solvente extractivo y reemplaza el solvente dispersivo por el SDS. En este enfoque, el SDS juega un papel importante: estimula la actividad de la proteinasa K (etapa ED) y aumenta la dispersión del solvente de extracción (etapa SA-DLLME). Además, el uso de muestras de cabello humano para determinar PBDE muestra las siguientes ventajas: método de muestreo no invasivo, transporte y almacenamiento de muestras simples y matriz estable.

# **CAPÍTULO III: DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS DE AGUA**

### **Aportes novedosos y destacados del capítulo III:**

- La combinación de un agente precipitante junto con el agente extractivo SDS mejoran la eficiencia de extracción de los OP.
- Se utilizó el método univariado para optimizar las variables que afectan a la extracción de los OP.
- La metodología cop-CAE-HPLC-UV es simple, rápida y efectiva y es notoriamente amigable con el medio ambiente.
- Es la primera vez que se aplica la metodología cop-CAE-HPLC-UV para la determinación de OP en muestras de agua para consumo humano.
- Se encontró metidatió (5,5 ng mL<sup>-1</sup>) y clorpirifos (6,4 ng mL<sup>-1</sup>) en muestras de agua de pozo de El Carrizal, Mendoza.

## **2.1 INT**

**RO**

**DU**

**CCI**

**ÓN**

El agua para consumo humano es una de las principales rutas de exposición a los OP. Existen reportes de muestras de agua con concentraciones de OP por encima de los 100 ng mL<sup>-1</sup> [135,194]. Debido a la neurotoxicidad que presentan y el potencial riesgo que ocasionan para la salud humana [64], es que se requiere de metodologías analíticas selectivas y sensible para determinar OP en muestras de agua para consumo humano. Como se ha destacado en secciones anteriores, la etapa de preparación de muestras cumple un rol importante en las metodologías analíticas para lograr el rendimiento analítico requerido para determinar OP en concentraciones traza. Muchas de las metodologías reportadas usan técnicas convencionales como la LLE y la SPE [195], para la extracción y aislamiento de los analitos desde la matriz.

La técnica CAE utiliza tensioactivos iónicos para extraer analitos desde muestras acuosas [102]. Hay publicaciones sobre la combinación de la técnica CAE con agentes de precipitación denominada extracción coacervativa asistida por coprecipitación o cop-CAE [196], la cual ha sido recientemente investigada y aplicada [197].

La técnica cop-CAE se basa en la formación de estructuras agregadas llamadas “admicelas o hemimicelas” por medio de interacciones electrostáticas entre los monómeros del tensioactivo iónico y las especies complejas con carga opuesta [197]. Las hemimicelas presentan un medio hidrófobo más alto que las micelas convencionales, y esta hidrofobicidad podría ser óptima para la química analítica de los OP [198]. La técnica cop-CAE se ha aplicado para la determinación de diferentes analitos, tales como estrógenos [199], colorante violeta [196] e hidrocarburos poliaromáticos o PAHs [198] por HPLC. Sin embargo, no ha sido aplicada para la determinación de OP en muestras de agua.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue desarrollar, estudiar, optimizar y validar la metodología cop-CAE para la extracción y preconcentración de los OP más usados en Argentina (gutión, fenitrotión, paratión, metidatión y clorpirifos) para su determinación en muestras de agua de grifo, pozo y río por HPLC-UV.

Se analizaron muestras de agua de grifo de la Ciudad de Mendoza, la cual es agua suministrada por una red de agua tratada químicamente; muestras de agua de pozo de El Carrizal, Luján de Cuyo, la cual es agua donde la provisión se da por pozos comunitarios y no se trata antes de la distribución y muestras de río que se tomaron de los dos ríos principales de la Provincia de Mendoza (Río Mendoza y Río Tunuyán), los cuales son utilizados como fuente de agua para consumo humano, así como también para generación de energía hidroeléctrica, agricultura y otras actividades industriales. La validación de la metodología cop-CAE-HPLC-UV se realizó en términos de LOD, reproducibilidad, recuperación (%) y rango lineal.

### 2.2.1 REACTIVOS Y SOLVENTES

Los estándares de OP que se utilizaron fueron: Clorpirifos (CPF), pureza del 99,9%, Metidati6n (MTD), pureza del 99%, Parati6n (PA), pureza del 98% y Guti6n (GU), pureza del 99% y Fenitroti6n (FE) pureza del 99% (Chem Service Inc., EE.UU.). Los est6ndares de OP se conservaron en oscuridad y a -20 °C. Las soluciones madre de las mezclas de OP se prepararon en metanol y por separado, a una concentraci6n de 5 g L<sup>-1</sup>. Para futuras diluciones, las mismas fueron preparadas en metanol a 500 mg L<sup>-1</sup> y conservadas en viales color caramelo de 2 mL a -20 °C. Se emple6, metanol de grado HPLC (MeOH, Sintorgan, Argentina), sulfato de aluminio con pureza del 99,76%, (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, Carlo Erba, Francia), sulfato de magnesio con pureza del 99% (MgSO<sub>4</sub>, Merck, Alemania), 6cido clorh6drico concentrado (HCl, Dalton, Argentina), SDS de pureza 99% (NaSO<sub>4</sub>C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>, Promega, EE.UU.), 6cido c6trico con pureza del 98% (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, Mallinckrodt Chemical Works, EE.UU.) y para neutralizar y preparar la soluci6n tamp6n de citrato de sodio se emple6 hidr6xido de sodio con pureza del 97% (NaOH, Anedra, Argentina). Se obtuvo agua ultrapura (18 MΩ cm) de un sistema de purificaci6n de agua Milli-Q (Millipore, Par6s, Francia). Todos los reactivos empleados para este trabajo experimental son de grado anal6tico o superior. Se prepar6 6cido clorh6drico al 0,01 M, la cual se emple6 luego para preparar las soluciones de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> y MgSO<sub>4</sub> 0,1 M en HCl 0,01 M. La soluci6n de SDS se prepar6 en soluci6n acuosa a una concentraci6n de 0,1 M. La soluci6n tamp6n de citrato de sodio se prepar6 a partir de una soluci6n de 0,1 M de 6cido c6trico y se llev6 a pH 4 con NaOH.

## **2.2.2 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA Y SOFTWARE**

### *CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV*

La separación analítica se llevó a cabo utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector ultravioleta/visible, marca Perkin Elmer serie 200 equipado con una bomba cuaternaria acoplado a un detector UV Perkin Elmer serie 200 (Shelton, CT, Estados Unidos). El software utilizado para controlar el equipo de HPLC externamente, se denomina Total ChromNavigator. La separación analítica se llevó a cabo empleando una columna ZORBAX sb-aq marca Agilent Technologies (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) con un guarda columna con relleno  $\text{C}_{18}$  marca Agilent Technologies. El horno se programó a 25 °C. La fase móvil utilizada constó de MeOH en la bomba A y agua ultrapura en la bomba B a un flujo de 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$ . El programa de gradiente se programó de la siguiente manera: 0-5 min, 50% A; 5-8 min, 50-60 % A, 8-17 min, 60 % A, 17-30 min, 60-77 % A y, finalmente, 30-31 min, 77-95 % A. La longitud de onda de trabajo fue de 220 nm. La identificación de los picos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de los estándares de referencia.

### *ESPECTROFOTÓMETRO UV*

Para identificar la longitud de onda en la que cada organofosforado tiene su mayor absorbancia, se utilizó un equipo de UV de tipo arreglo de diodos o DAD (del inglés *diode array detector*), marca Perkin Elmer modelo Lambda 35. El equipo tiene un rango de barrido de 190 a 1100 nm con un ancho de banda de 0,5 a 4 nm (variable). Se utilizó una ultra micro celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz con volumen de la cámara de 30  $\mu\text{L}$  y volumen de llenado de 50  $\mu\text{L}$ , marca Perkin Elmer modelo B0631079.

## **2.2.3 MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

La metodología analítica propuesta (cop-CAE-HPLC-UV) se aplicó para la determinación de 5 OP en muestras de agua de dos ubicaciones de la provincia de Mendoza, Argentina: la ciudad de Mendoza y El Carrizal, y las dos cuencas principales: el río Mendoza y el río Tunuyán. La provincia de Mendoza se encuentra en el piedemonte andino (32°53'00"S, 68°49'00"W) y se caracteriza por condiciones climáticas áridas, con un régimen de precipitaciones de verano de 250 mm por año. Debido a las condiciones desérticas de la región, el agua es escasa, por lo tanto, se considera prioritario su cuidado y distribución.

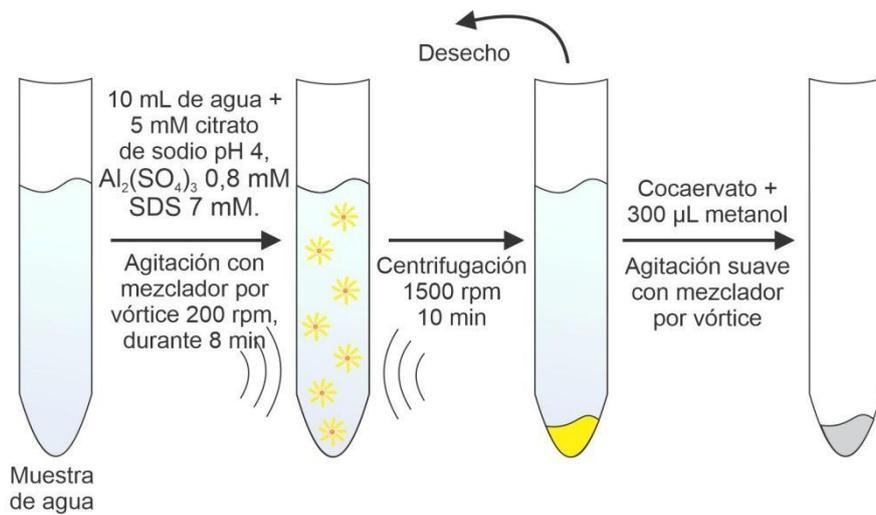
Se recogieron las muestras de agua corriente y de pozo después de dejarla correr durante aproximadamente 20 minutos. Se recogieron muestras de agua del río Mendoza y del río Tunuyán a 10 cm de profundidad de la superficie. Todas las muestras se recogieron sin burbujas

de aire y se conservaron en botellas color caramelo a -20 °C. Las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de 0,22 µm de tamaño de poro y se analizaron dentro de las 24 h posteriores a la recolección.

#### **2.2.4 EXTRACCIÓN COACERVATIVA ASISTIDA POR COPRECIPITACIÓN**

En un tubo de centrifuga de 15 mL de capacidad se colocó una alícuota de 10 mL de muestra de agua y alícuotas de solución tampón de citrato de sodio 5 mM pH 4,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  0,8 mM y SDS 7 mM. Luego, se agitó en mezclador por vórtice (aproximadamente 1500 rpm) durante 8 minutos para provocar la formación de las micelas adsorbidas en el soporte sólido de la especie hepta cargada de aluminio o la adsolubilización. Luego de haber agitado el tubo durante este tiempo, se lo dejó en reposo durante 5 minutos, formándose la fase de coacervato que se comenzó a separar de la solución acuosa observándose sólidos en suspensión similares a flóculos. Para acelerar la decantación, el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm (23,14 x g). El sobrenadante se retiró y descartó, y se conservó la fase coacervato. Luego se agregó 300 µL de MeOH al precipitado obtenido y se agitó suavemente en mezclador por vórtice (aproximadamente 300 rpm) hasta obtener una fase homogénea en la que el coprecipitado se disolvió totalmente. Una alícuota de 20 µL se inyectó y analizó en el equipo HPLC-UV (**Figura 9**).

### Extracción coacervativa asistida por coprecipitación (cop-CAE)



### Análisis instrumental: HPLC-UV

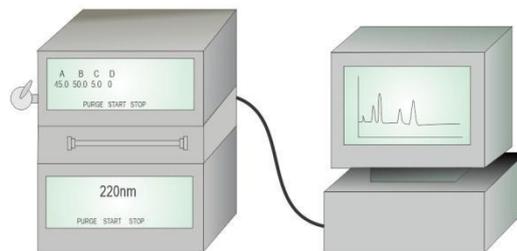


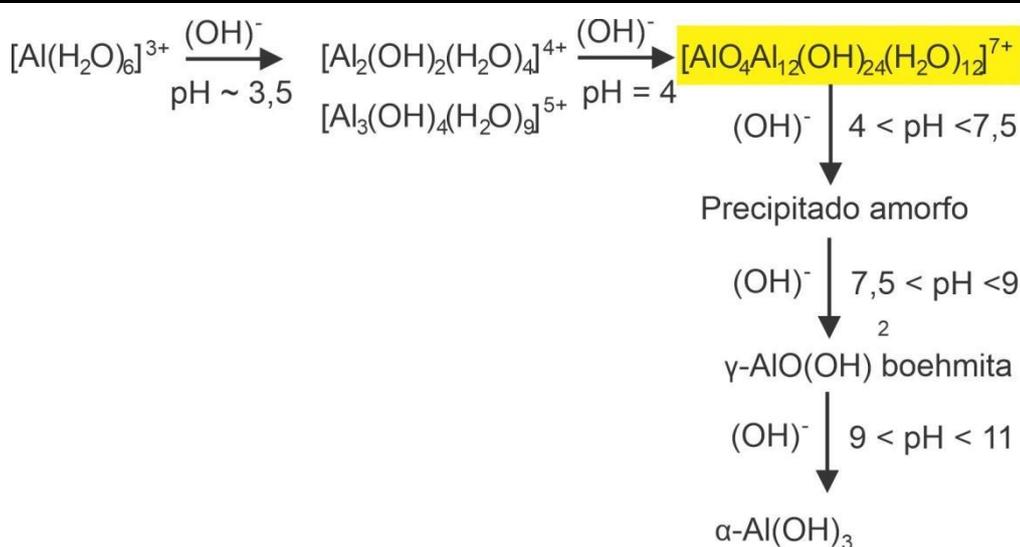
Figura 9. Diagrama de la metodología de cop-CAE previo a la determinación por HPLC-UV.

Al igual que la mayoría de las técnicas utilizadas para la preparación de muestras, la eficiencia de la cop-CAE puede estar condicionada por las variables fisicoquímicas del sistema de extracción, así como por la matriz de la muestra, condicionando así la sensibilidad de la metodología [196]. Las variables experimentales que podrían condicionar las respuestas analíticas de los OP se evaluaron en muestras acuosas sintéticas incluyendo el pH de la solución, la concentración de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  y SDS, el tiempo de agitación, el tiempo y la temperatura de extracción y el tiempo de centrifugación. Estos estudios se llevaron a cabo modificando una variable por línea de ensayos y manteniendo al resto constante. El área del pico cromatográfico se utilizó para evaluar el impacto de las condiciones experimentales modificadas sobre la señal analítica de los OP estudiados. Para optimizar cada variable, se consideró la respuesta relativa (RR (%)) para cada analito.

### **2.3.1 PRECURSOR DEL AGENTE DE COPRECIPITACIÓN Y EFECTO EL pH**

La literatura ha reportado el uso de diferentes agentes de coprecipitación para la técnica de cop-CAE incluyendo especies de aluminio [105], magnesio [198] y hierro [200], entre otras. Estas especies se han propuesto en combinación con diferentes tensioactivos aniónicos, incluyendo al

SDS [105,198], al sulfosuccinato de sodio [201] y al oleato de sodio [105], siendo el SDS el más utilizado. Los compuestos de aluminio principalmente reportados como precursores del agente coprecipitante son el cloruro de aluminio y el sulfato de aluminio, debido a que las especies de aluminio (óxidos, hidróxidos y otros compuestos precipitantes) ocurren en un amplio rango de pH de 3,5~12,5 [202]. La **Figura 10** presenta las especies de aluminio como función del valor del pH de la solución. Por otro lado, es necesario considerar que el pH del medio de extracción también afecta a las interacciones electrostáticas en el sistema hemimicelar, condicionando así su hidrofobicidad [197]. Estos aspectos podrían condicionar la eficiencia de la extracción de la técnica de cop-CAE. Adicionalmente a las características mencionadas, las especies de aluminio permiten elegir un pH de extracción apropiado al trabajo con un amplio rango de variedad de analitos, los cuales podrían disociarse o degradarse a un valor de pH específico de trabajo [196].



*Figura 10. Distintas especies de aluminio representadas en función del valor de pH de la solución en la que se encuentra. La especie resaltada en amarillo es la formada en este trabajo.*

En base a estas consideraciones, se usó  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  como precursor del agente de coprecipitación, debido a su valor de  $\text{pK}_a$  (3,3-3,6) y los ensayos para evaluar el efecto del pH en la eficiencia de extracción y, por lo tanto, en la respuesta analítica de los OP, se llevaron a cabo con 2 mM  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  dentro del rango de pH 4-9. La metodología cop-CAE se llevó a cabo como se describe en la sección 3.3.4. La **Figura 11** muestra el RR de cada OP a diferentes valores de pH de extracción ensayados. Se observó que el máximo RR para los OP se alcanzó a pH 4. A este pH, la especie de aluminio predominante es el complejo hepta de aluminio cargado ( $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$ ) [202], que es relevante para la formación de las hemimicelas. El pH 4 maximiza las cargas superficiales positivas de las especies de aluminio, lo que a su vez mejora la interacción de las especies de aluminio con el tensioactivo aniónico, SDS. Se usó citrato de

sodio (5 mM, pH 4) en los experimentos posteriores para ajustar el pH del medio de extracción a pH 4.

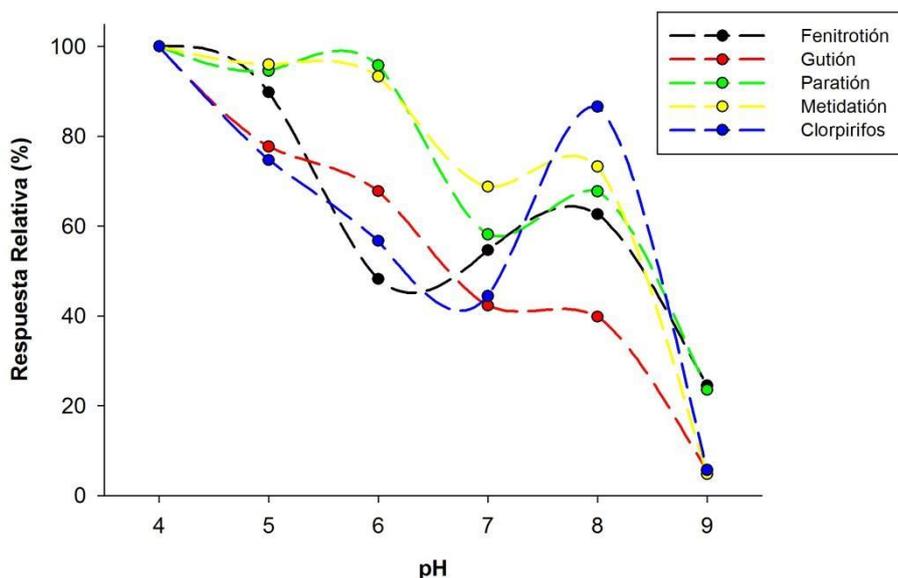


Figura 11. Efecto del pH de extracción sobre la respuesta relativa (%) de cada OP.

### 2.3.2 CONCENTRACIÓN Y ORDEN DE ADICIÓN DE $Al_2(SO_4)_3$ Y SDS

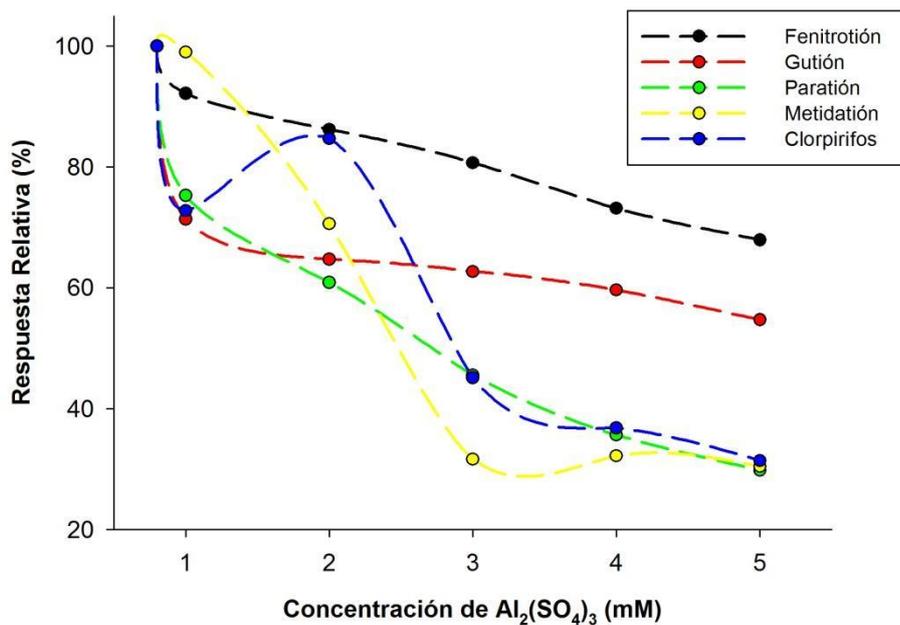
El efecto de la concentración de  $Al_2(SO_4)_3$  y SDS, así como su orden de adición, son variables que condicionan la eficiencia de extracción de la técnica de cop-CAE y, por lo tanto, la respuesta analítica de los OP. La adición de  $Al_2(SO_4)_3$  conduce a la formación de la especie de aluminio, el complejo hepta-cargado necesario como soporte hemimicelar. La formación de la hemimicelas estaría condicionada por el área superficial del complejo cargado, que depende de su concentración [196]. En la técnica CAE, los monómeros de tensioactivo se agregan por encima de una concentración micelar crítica o CMC, lo que lleva a la formación de micelas que luego constituyen la fase coacervativa. El CMC para el SDS es de 8,1 mM. La CHC (concentración hemimicelar crítica) en la cop-CAE es análoga a la CMC en la CAE [196]. La preexistencia de monómeros de SDS cuando se agrega el  $Al_2(SO_4)_3$  puede formar complejos de SDS [196] que podrían afectar a la formación dinámica de las especies de aluminio adecuadas, requeridas para el soporte hemimicelar. Por lo tanto, el orden de adición de los reactivos juega un rol importante en la formación hemimicelar, ya que podría afectar a la eficiencia de extracción de la técnica cop-CAE y, así, la respuesta analítica de los OP analizados.

Basados en estas consideraciones, la concentración de  $Al_2(SO_4)_3$  en HCl (para evitar el efecto del ión común) se optimizó primero y luego, la concentración de SDS. Se llevaron a cabo dos

ensayos para evaluar la importancia de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  y SDS y el rol de cada uno de ellos en la eficiencia de extracción de la técnica, así como su impacto sobre la respuesta analítica de cada OP: 1) ensayo de diferentes concentraciones de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  entre 0,5-5 mM y de SDS entre 4-8 mM y 2) ensayo del orden de adición de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  y SDS: a)  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  sin pre-existencia de SDS; b)  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  con pre-existencia de SDS.

La técnica de cop-CAE se llevó a cabo con se ha descrito en la sección 3.2.4. La máxima RR se obtuvo para  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  0,8 mM (**Figura 12.A.**) y para SDS 7 mM (**Figura 12.B.**). Los ensayos evidenciaron que tanto el agente tensioactivo como el agente de coprecipitación, por separado, no fueron capaces de extraer de manera eficiente a los OP. La respuesta relativa de los OP en el estudio del orden de adición fue ligeramente más alta (1-4%) cuando se agregó  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  sin pre-existencia de SDS.

Por otro lado, los resultados obtenidos con concentraciones de SDS menores a 7 mM podrían atribuirse a una insuficiencia de los monómeros de SDS disponibles para cubrir la superficie del núcleo de aluminio, lo que lleva a hemimicelas de baja densidad de los monómeros adsorbidos. Este hecho podría afectar las características hidrófobas de las hemimicelas, condicionando así la afinidad con los OP. A medida que aumenta la concentración de SDS, aumenta la densidad de los monómeros de SDS sobre el núcleo de aluminio, hasta que la cobertura de SDS alcanza un equilibrio de saturación [203]. Bajo estas condiciones, la técnica cop-CAE mostró su mayor respuesta relativa, sin observarse mejoras a concentraciones de SDS más altas.



**B**

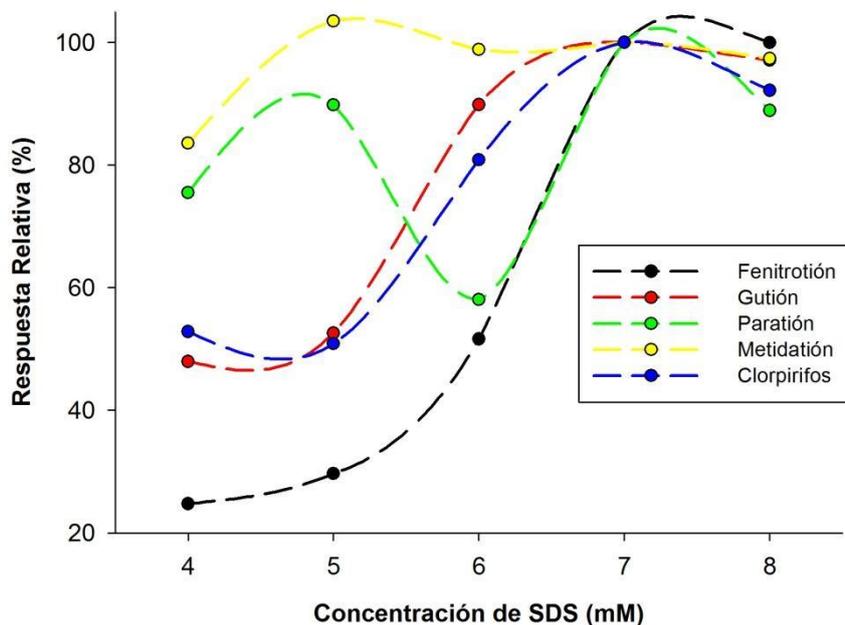


Figura 12. Efecto de la concentración de: A)  $Al_2(SO_4)_3$  B) SDS, sobre la respuesta relativa (%) de cada OP.

Asimismo, se descartaron las concentraciones de  $Al_2(SO_4)_3$  menores a 0,8 mM debido a que la fase de coacervato no se formó, volviéndose no factible la aplicación de la técnica. Para concentraciones mayores a 0,8 mM las especies de aluminio tienden a condensar y así, el soporte hemimicelar tiene área superficial bajo [199]. En consecuencia, la densidad de los

monómeros de SDS sobre los núcleos de aluminio disminuye, afectando la hidrofobicidad de las hemimicelas y, consecuentemente, la eficiencia de extracción de la técnica cop-CAE. Esto afecta a la respuesta analítica de los OP como se observa en la **Figura 12**. Basado en estas condiciones y resultados, se eligió para futuros ensayos  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  0,8 mM y SDS 7 mM.

### 2.3.3 EFECTO DEL TIEMPO DE AGITACIÓN

La agitación de la solución durante el proceso de extracción es esencial para facilitar la transferencia de masa de los analitos desde el seno de la matriz hacia la fase hemimicelar [194] y para acelerar la formación de las hemimicelas [105]. Basados en estas consideraciones, se ensayó la agitación con mezclador por vórtice a 1500 rpm (8 xg) en diferentes tiempos (2-15 min) para evaluar su impacto sobre la eficiencia de extracción de los 5 analitos estudiados. La metodología se llevó a cabo como se ha descrito en la sección 3.5. La **Figura 13** muestra que la mayor respuesta relativa de los OP fue agitando el sistema durante 8 min. Los tiempos de agitación mayores a 8 min no mostraron mejoras sobre la respuesta analítica de los OP. Por lo tanto, se utilizó agitación con mezclador por vórtice durante 8 minutos como tiempo de agitación óptimo para los siguientes ensayos.

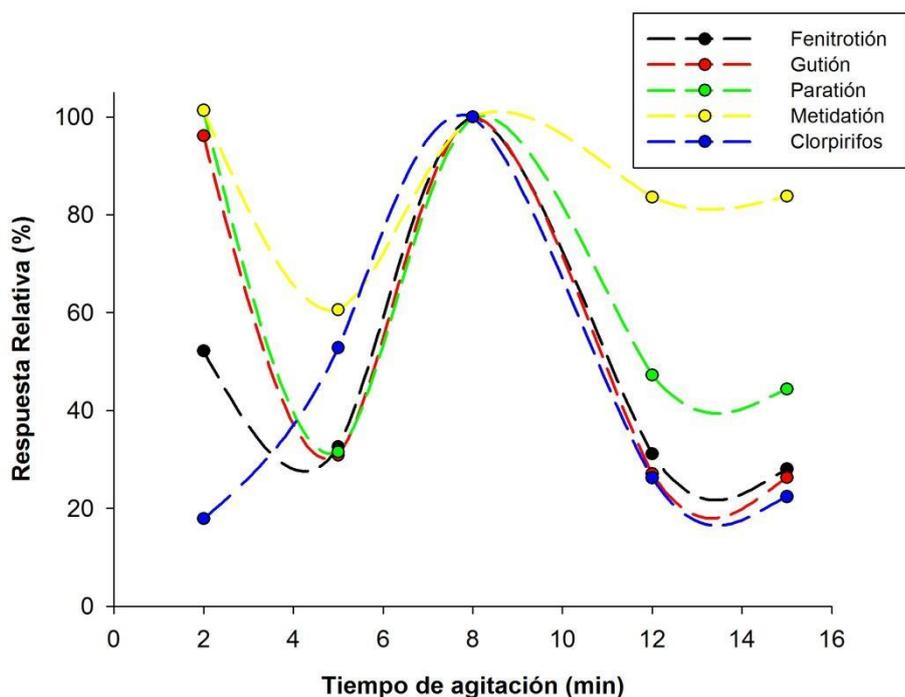


Figura 13. El efecto del tiempo de agitación sobre la respuesta relativa (%) de los OP.

### **2.3.4 VARIABLES COMPLEMENTARIAS: TIEMPO Y TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN Y TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN**

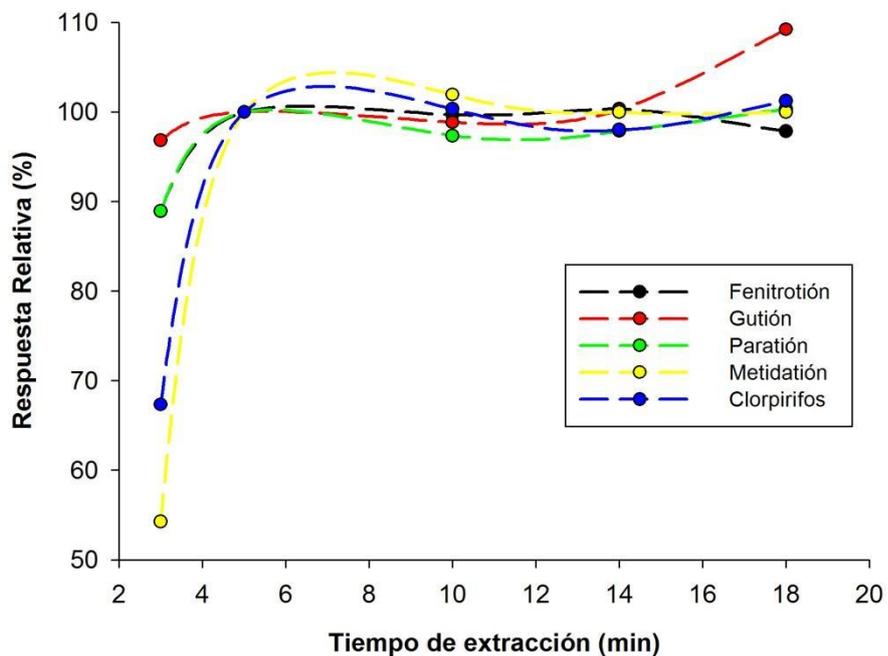
En las técnicas CAE y cop-CAE, el tiempo y la temperatura de extracción juegan importantes roles [196]. Estas variables afectan el proceso de transferencia de masa que gobierna la partición de los analitos entre la solución acuosa y las hemimicelas, así como también gobiernan el proceso de deshidratación de las micelas y de las hemimicelas, lo cual condiciona el volumen resultante de la fase coacervato [196].

La centrifugación es necesaria para acelerar la partición de los analitos desde la fase acuosa dadora hacia la fase coacervato aceptora [103]. Estas variables condicionan el factor de preconcentración de la técnica de extracción, adicionalmente a la eficiencia de la extracción, afectando así la sensibilidad de la metodología analítica resultante. De este modo, se llevó a cabo 3 ensayos diferentes para evaluar el efecto de esas variables sobre la respuesta analítica de los 5 OP en estudio. La metodología se llevó a cabo como se ha descrito en la sección 4.5.

El tiempo de extracción se mantuvo a 5 min, mientras se ensayaron los estudios de temperatura de extracción a 0 °C, 25 °C, 35 °C and 50 °C. Dentro de estos resultados no se observó cambios significantes sobre la respuesta relativa. Por lo tanto, se eligió 25 °C como temperatura de extracción para los siguientes ensayos. A continuación, se ensayaron diferentes tiempos de extracción a una temperatura fija de extracción de 25 °C, dentro del rango de 3-20 min. La mayor respuesta relativa se obtuvo con 5 min de tiempo de extracción y se seleccionó para los siguientes ensayos (**Figura 14.A.**).

A su vez, se estudió el tiempo de centrifugación a 1500 rpm (232 x g) en el rango de 8-20 min. La mayor respuesta relativa se obtuvo a 10 min. Por lo tanto, se seleccionó 10 minutos como tiempo de centrifugación para los futuros ensayos (**Figura 14.B.**). Los resultados obtenidos están en concordancia con aquellos previamente reportados en la literatura de sistemas de extracción comparables [199].

A



B

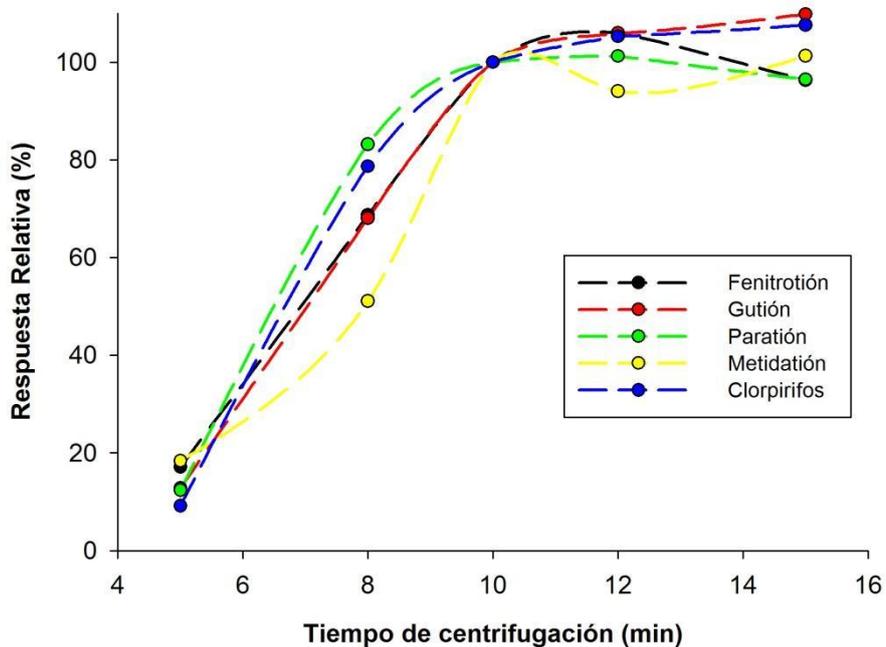


Figura 14. Efecto de A) el tiempo de extracción y B) el tiempo de centrifugación sobre la respuesta relativa (%) de los OP.

### **2.3.5 ACONDICIONAMIENTO DE LA FASE COACERVATO PARA EL ANÁLISIS POR HPLC-UV**

Dado que la fase coacervato coprecipitada resulta viscosa luego de la centrifugación, no puede inyectarse como tal en el equipo de HPLC ya que se debe evitar obstruir al equipo. Por ello, se consideraron diferentes agentes de dilución para el acondicionamiento adecuado de la fase coacervato antes de su inyección por HPLC. Entre los agentes de dilución en literatura, se informó el uso de MeOH [204], mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v/v [199], así como soluciones de HCl y HCl concentrado [205]. Los ensayos se realizaron con el total de fase coacervato obtenida (700 µL) llevando la solución a 1 mL de volumen final. El procedimiento de extracción se llevó a cabo como se describió en la sección 3.5. Entre los agentes de disolución estudiados, 300 µL de MeOH mostraron el mejor rendimiento, logrando una solución homogénea después de agitar con mezclador por vórtice. Las soluciones acuosas (MeOH: H<sub>2</sub>O 1:1 v/v y HCl 0,02 mM) dieron lugar a una solución turbia y no se logró una solución homogénea. El HCl concentrado conduce a una solución homogénea luego de agregar 300 µL a la fase de coacervado; sin embargo, el pH de la solución resultante no era compatible con la columna cromatográfica, y también se descartó. Sobre la base de estos resultados, se utilizaron 300 µL de MeOH para disolver la fase de coacervato resultante para el análisis de HPLC.

2.4 RE

NDI

MIE

NT

O

AN

ALÍ

TIC

O Y

AP

LIC

ACI

ÓN

A

MU

ES

TR

AS

RE

88

La metodología propuesta, cop-CAE-HPLC-UV, se validó en términos de linealidad, precisión intra e inter día, sensibilidad y recuperación. Las figuras de mérito analítico están resumidas en la **Tabla 14**. Los factores de enriquecimiento obtenidos EF (por *enrichment factor*) en condiciones óptimas fueron de 10. El EF se calculó como el radio entre el volumen de solución acuosa y el volumen de la fase homogenizada de coacervato. Cada secuencia analítica incluyó un blanco de procedimiento. La determinación de los OP se logró usando una curva de calibración construida con muestras sintéticas con agregado de OP a diferentes niveles de concentración previo a la preparación de muestras.

La curva de calibración se ajustó utilizando una ecuación lineal, la cual demostró linealidad satisfactoria en los rangos de concentración entre 5,7-500, 3,5-500, 8,3-400, 3,5-500 y 2,2-500 ng mL<sup>-1</sup> para MTD, GU, FE, PA y CPF, respectivamente, los cuales son rangos recomendados para los análisis de agua [206]. Los datos de calibración resultaron en coeficientes de correlación  $R > 0,99$  para todos los analitos. La precisión de la metodología se evaluó sobre 3 réplicas, obteniendo valores de RSD <8%. La precisión se midió en repetitivas condiciones (mismo operador, mismo instrumento) de acuerdo a la Guía Internacional AOAC [207]. Las condiciones repetitivas se dividieron en precisión intra e inter día. Estos ensayos se realizaron en muestras de agua a niveles de 50, 100 y 250 ng mL<sup>-1</sup> de OP. Los LOD se calcularon como tres veces la desviación estándar del blanco y los LOQ como diez veces la desviación estándar del blanco para las medidas individuales, según la IUPAC. Para validar la metodología analítica, se realizó un estudio de recuperación de OP sobre muestras de agua de diferentes tipos. Las muestras se enriquecieron con un estándar de mezcla de OP que alcanzó concentraciones de 10, 50 y 200 ng mL<sup>-1</sup> (**Tabla 15**). Se detectó clorpirifos y metidatió en muestras de agua de pozo de El Carrizal, a niveles de concentración de 6,4 y 5,5 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente, pero dichos valores se encuentran por debajo del LOQ, por lo que, se cuantificó con el estudio de la recuperación agregando 10, 50 o 200 ng mL<sup>-1</sup>. En la **Figura 15** se muestra un cromatograma obtenido para una muestra de agua de grifo de la Ciudad de Mendoza analizada con agregado de 10 ng mL<sup>-1</sup> de estándar de mezcla de OP y otro sin agregado de estándar.

Tabla 14. Figuras de mérito analítico de la metodología cop-CAE-HPLC-UV para determinar OP en muestras de agua.

	MTD	GU	FE	PA	CPF
LOD [ng mL <sup>-1</sup> ]	1,7	1,1	2,5	1,1	0,7
RL [ng mL <sup>-1</sup> ]	5,7-500	3,5-500	8,3-500	3,5-500	2,2-500
Coef. R	0,997	0,996	0,999	0,997	0,992
RSD [%]	6	8	2	2	6
Recuperación [%]	92	88	82	81	97
Curva de calibración [ng mL <sup>-1</sup> ]	$y=3,54 \times 10^5 x - 2,52 \times 10^5$	$y=4,9 \times 10^5 x - 3,83 \times 10^5$	$y=8,35 \times 10^5 x - 5,7 \times 10^5$	$y=3,07 \times 10^5 x - 4,77 \times 10^4$	$y=4,36 \times 10^5 x - 3,41 \times 10^5$

	Agregado [ng mL <sup>-1</sup> ]	50	100	250
		Encontrado [ng mL <sup>-1</sup> ]		
MTD		45,5±1	90,1±3	233±5
GU		42,5±1	87,4±3	215±6
FE	Precisión intra-día	39,0±1	80,1±2	205±4
PA		39,5±1	80,2±1	203±5
CPF		46,5±1	92,1±2	233±3
MTD		45,9±1	91,3±4	230±8
GU		43,5±1	88,2±5	218±8
FE	Precisión inter-día	40,3±1	80,2±4	198±8
PA		40,1±1	80,3±2	198±8
CPF		46,9±1	94,4±4	233±8

Tabla 15. Estudio de recuperación y aplicación a muestras reales de la metodología cop-CAE-HPLC-UV para determinar OP en muestras de agua.

OP	Encontrado [ng mL <sup>-1</sup> ]	Agregado [ng mL <sup>-1</sup> ]					
		10		50		200	
		Encontrado [ng mL <sup>-1</sup> ] <sup>35</sup>	R [%] <sup>36</sup>	Encontrado [ng mL <sup>-1</sup> ]	R [%]	Encontrado [ng mL <sup>-1</sup> ]	R [%]
<b>Agua de grifo, Ciudad de Mendoza</b>							
MTD	<LOQ	9,2±0,2	92	45,5±0,6	91	184±4	92
GU	<LOQ	8,8±0,2	88	42,5±0,9	85	176±4	88
FE	<LOQ	8,2±1,3	82	39,3±1,2	79	190±7	95
PA	<LOQ	8,1±1,3	81	39,5±1,2	79	190±7	95
CPF	<LOQ	9,7±0,1	97	49,7±0,4	99	194±2	97
<b>Agua de pozo, El Carrizal</b>							
MTD	5,5±0,2	15,1±0,2	96	51,0±0,4	91	193±4	94
GU	<LOQ	8,9±0,2	89	44,0±0,9	88	178±4	89
FE	<LOQ	8,3±1,2	83	40,4±1,1	81	192±6	96
PA	<LOQ	8,3±1,2	83	40,4±1,1	81	189±8	95
CPF	6,4±0,1	16,1±0,1	97	55,3±0,3	100	200±2	99
<b>Agua de río, Río Mendoza</b>							
MTD	<LOQ	9,3±0,2	93	45,9±0,8	92	186±3	93
GU	<LOQ	8,9±0,2	89	46,5±0,4	93	177±4	89
FE	<LOQ	8,3±1,2	83	40,4±1,1	81	174±8	87
PA	<LOQ	8,2±1,3	82	40,5±1,1	81	189±8	95
CPF	<LOQ	9,6±0,1	96	46,5±0,9	93	192±2	96
<b>Agua de río, Río Tunuyán</b>							
MTD	<LOQ	9,4±0,2	94	45,7±0,5	91	187±3	94
GU	<LOQ	8,8±0,2	88	43,5±0,8	87	176±4	88
FE	<LOQ	8,4±1,1	84	44,0±0,8	88	174±8	87
PA	<LOQ	8,2±0,3	82	41,3±1,0	83	189±8	85
CPF	<LOQ	9,6±0,1	96	46,3±0,6	92,6	192±2	96

<sup>35</sup> 95% intervalo de confianza; n=3. Resultados expresados como la media±SD.

<sup>36</sup> R: Estudio de recuperación= [(Encontrado-base)/agregado]x100  
Las condiciones de extracción son las descriptas en la sección 3.2.4.

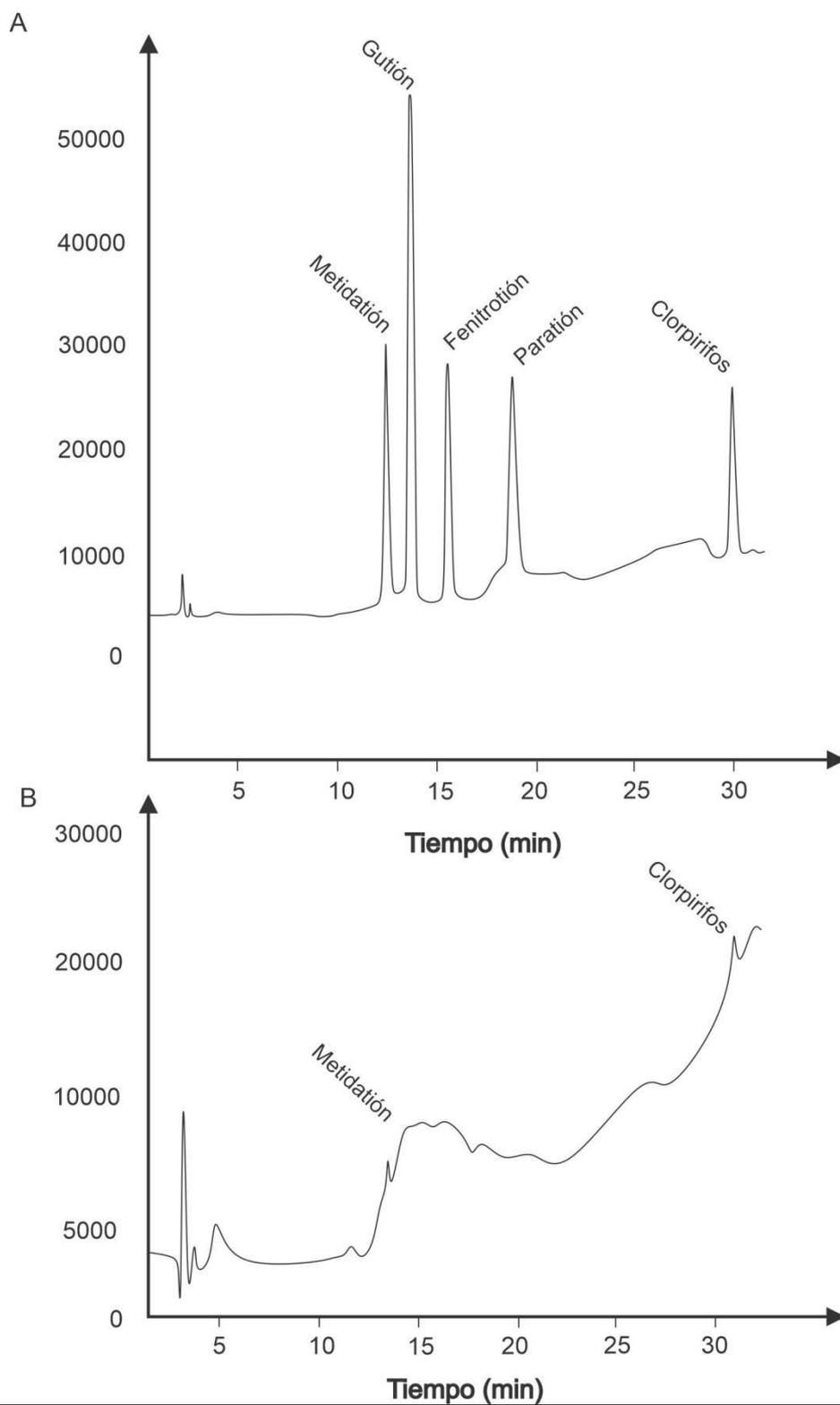


Figura 15. Cromatograma de una muestra de agua de pozo proveniente de El Carrizal, Mendoza A) con agregado de OP a  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  y B) sin agregado de estándar.

2.5 CO

MP

AR

ACI

ÓN

DE

cop

-

CA

E-

HP

LC-

UV

CO

N

OT

RA

S

ME

93

TO

DO

LO

GÍA

S

AN

ALÍ

TIC

AS

PA

RA

DE

TE

RMI

NA

R

OP

EN

MU

ES

TR

AS

DE

AG

UA

La metodología propuesta, cop-CAE-HPLC-UV, desarrollada para determinar 5 OP en muestras de agua presenta varias características que la hacen adecuada para el análisis de rutina. La **Tabla 16** resume las metodologías analíticas presentadas en la literatura para determinar OP en muestras de agua mediante el uso de HPLC. Las cifras de mérito analítico de la metodología cop-CAE-HPLC-UV (rango lineal, RSD (%), recuperación (%), tiempo de ejecución, LOD y LOQ) fueron comparables a las reportadas anteriormente. La técnica de preparación de muestras propuesta, cop-CAE, es adecuada para la preparación de lotes de 20 muestras, factibles de realizarse en 23 minutos, incluida una etapa de extracción de 5 minutos, es decir, 1 muestra cada 1,15 minutos utilizando equipos simples disponibles en la mayoría de los laboratorios. Esta metodología de preparación de muestras no incluye etapas de evaporación de solvente ni requiere solventes tóxicos, como se usa regularmente para LLE y SPE y es tan barata como un procedimiento sencillo donde solo se usan solventes y otros reactivos.

Tabla 16. Comparación de la metodología cop-CAE-HPLC-UV con otras metodologías para determinar OP en muestras de agua.

Técnica instrumenta l	Técnica de extracción	Tiempo de extracción [min]	Volumen de muestra [mL]	Volumen de solvente de extracción [mL]	OP	Rango lineal [ng mL <sup>-1</sup> ]	LOD [ng mL <sup>-1</sup> ]	RSD [%]	Recuperación [%]	Ref
HPLC-DAD	IPA <sup>37</sup> -LLE	20	5	1,5	CPF, DZ, MTD, FE	4,8-450	1,4-2,5	4-9	73-105	[208]
HPLC-DAD	UASEME	3	5	0,15	isoC, FM, mePA, FE, PA, FF, FM	1-200	0,1-0,3	3-6	86-106	[135]
HPLC-DAD	CA <sup>38</sup> -CPE	11	5	5	GU, mePA, FE, CPF, DZ,PTF <sup>39</sup>	50-5000	1-30	0,4-12	80-113	[209]
HPLC-UV	MTON-HE <sup>40</sup>	20	500	--	CPF, DM, TCF	0,1-15	0,03	2,4-8,7	89-97	[210]
HPLC-UV	SMNM <sup>41</sup> -SBSE	42	60	1,5	PSL, ET, DZ,CPF	1-1000	0,07-0,89	<6	81-105	[152]
HPLC-UV	Cop-CAE	5	10	--	MTD, GU, FE, PA, CPF	2,2-500	0,7-2,5	2-8	81-97	Actual

<sup>37</sup> IPA: Asistido por pares iónicos (del inglés *ion-pair assisted*)

<sup>38</sup> CA: extracción con una mezcla de tensioactivos catiónico y aniónico (del inglés *catanionic*)

<sup>39</sup> PTF: protiofos

<sup>40</sup> MTON-HE: nanopartículas de óxido de titanio magnético para extracción con hemimicelas (del inglés *Magnetic titanium oxide nanoparticles for hemimicelle extraction*)

<sup>41</sup> SMNM: nanocompuesto auto-magnético monolítico (del inglés *self-magnetic nanocomposite monolithic*)

2.6 CO

NC

LU

SIO

NE

S

PA

RCI

AL

ES

Esta es la primera vez que se propone la metodología cop-CAE-HPLC-UV para la determinación de OP en muestras de agua. El método univariado utilizado para optimizar la metodología permitió estudiar individualmente las variables pertinentes y comprender mejor los principios físico-químicos que rigen la técnica de extracción. La metodología analítica propuesta basada en cop-CAE demostró ser un enfoque sensible y eficaz para la preparación de muestras de agua para la determinación de OP por HPLC-UV. La técnica de cop-CAE ofrece una alternativa analítica conveniente para determinar los OP en diferentes muestras de agua con figuras de alto rendimiento. Además de ser simple, rápida y efectiva, esta técnica analítica tiene características ecológicas considerando que utiliza un pequeño volumen de solvente no tóxico con un mínimo de residuos. La metodología propuesta podría acoplarse fácilmente a otra instrumentación analítica, si fuera necesario.

Bajo condiciones de trabajo optimizadas, los LOD estuvieron en el orden de nanogramos por mililitro, adecuados para aplicaciones del mundo real con una precisión aceptable para niveles

traza según las regulaciones internacionales, como la EPA. La metodología desarrollada se aplicó con éxito para analizar muestras de agua de los dos principales ríos de la provincia de Mendoza y dos ubicaciones de la provincia de Mendoza. Dos de los cinco OP analizados (MTD y CPF) se determinaron en muestras de agua de pozo. Teniendo en cuenta su baja vida media, podría inferirse que estos OP se utilizaron recientemente cerca de la región muestreada. Debido a la escasez de recursos hídricos en la región, el hallazgo aquí reportado es una contribución significativa, ya que se propone una metodología simple y de bajo costo para monitorear las fuentes naturales de agua para usos humanos y agrícolas.

**CAPÍTULO IV: PRIMER REPORTE DE  
RETARDANTES DE LLAMA FOSFORADOS,  
PLASTIFICANTES Y SUS METABOLITOS EN  
PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES EN ARGENTINA**

#### **Aportes novedosos y destacados del capítulo IV:**

- La ocurrencia de PFR, plastificantes y sus metabolitos, se determinó por primera vez en Argentina.
- EHDPP y TBOEP fueron los PFR/plastificantes más abundantes encontrados en las matrices de agua residual.
- BBOEP y EHPHP son los metabolitos de TBOEP y EHDPP, respectivamente, y fueron los metabolitos de PFR más abundantes encontrados en las muestras de agua residual.
- La carga normalizada de población encontrada de metabolitos de PFR en Argentina fue un orden de magnitud menor que la encontrada en Europa en las ciudades de Bruselas y Amberes (Bélgica), Atenas (Grecia), Ginebra (Suiza) y Vilna (Polonia).

El presente capítulo se desarrolló en el marco del proyecto internacional denominado *Sinergising international research studies into the environmental fate and behavior of toxic organic chemicals in the waste stream, Program H2020* (Sinergia de estudios de investigación internacionales sobre el destino ambiental y el comportamiento de químicos orgánicos tóxicos en las corrientes de desechos). INTERWASTE ID# 734522, 2017-2020 coordinado por el Dr. Stuart Harard de la Universidad de Birmingham, Reino Unido. La Dra. Jorgelina Altamirano es la Directora del nodo argentino y quien dirigió en Argentina el trabajo explicado a continuación.

**3.1 INT**

**RO**

**DU**

**CCI**

**ÓN**

Después de la prohibición de ciertos BFR y su incorporación a la lista de POP debido a sus problemas de toxicidad, los PFR se han implementado como una alternativa para los BFR [76,211]. Actualmente, los PFR se usan ampliamente como retardantes de llama y plastificantes en aplicaciones industriales como espumas de poliuretano, PVC, textiles, pulidores de pisos, lacas, resinas, pinturas, productos electrónicos y películas para envolver alimentos [78,212]. Los PFR pueden liberarse fácilmente al medio ambiente por abrasión y/o volatilización [88] y se han

detectado en aguas superficiales y sedimentos [89], polvo (incluidos sus metabolitos) [85] y muestras de orina humana [213], entre otros, alrededor del mundo. Por lo tanto, los humanos están potencialmente expuestos a estos químicos a través de diferentes rutas como el aire [214], la inhalación de polvo [215], la ingesta dietética [75] (es decir, alimentos y bebidas) y el contacto cutáneo y de manos a boca [7]. Diferentes estudios han investigado la toxicidad de los PFR [86], destacando serios inconvenientes para la salud. Por ejemplo, algunos PFR halogenados han demostrado ser cancerígenos en animales y se sospecha que son cancerígenos en humanos [216]. Además, estos PFR se han relacionado con dermatitis y efectos de alteración endocrina [217]. De lo contrario, los PFR no halogenados se han relacionado con efectos neurotóxicos [76].

Tal y como se explicó en el capítulo II, el monitoreo humano ofrece una estimación de la exposición de los PFR y sus metabolitos a nivel individual, pero, el monitoreo de muestras biológicas sigue estando sujeto a varias limitaciones. En particular, requiere la recolección de numerosas muestras de múltiples individuos, lo que puede ser costoso de organizar. Además, a menudo carece de una dimensión temporal (es decir, los individuos se muestrean solo una vez o, en el mejor de los casos, durante un período de 24 h), sufren un sesgo de selección y requieren aprobación ética. Estas desventajas limitan los intentos de evaluar la exposición a productos químicos en la población. Sin embargo, las excreciones humanas, por ejemplo la orina, se transportan a través de redes de alcantarillado a plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP, del inglés *wastewater treatment plant*). La extracción de la información química contenida en las aguas residuales sin tratar proporcionan información epidemiológicamente relevante siendo un enfoque innovador, denominado "epidemiología basada en aguas residuales" (WBE, del inglés *wastewater-based epidemiology*) [218]. Sin embargo, desde una perspectiva más amplia, el agua residual representa una muestra agrupada de excreciones humanas, que abarca muchos productos químicos y sus biomarcadores de exposición [218]. Así es como el contenido de las muestras de aguas residuales contienen biosólidos (los residuos sólidos de las aguas residuales se denominan biosólidos porque usualmente contienen macronutrientes, micronutrientes y materia orgánica [219]) y sobrenadantes (orina, aguas superficiales, fluviales y de uso industrial y doméstico, entre otras). Recientemente, se ha obtenido información de un amplio grupo de compuestos antropogénicos tales como productos farmacéuticos [220], productos de cuidado personal y drogas ilícitas [221,222], PBDE y nuevos BFR [223], antioxidantes fenólicos [224] y PFR [225], entre otros.

En este capítulo, se investigó por primera vez la ocurrencia y los niveles de concentración de 17 PFR y 12 de sus metabolitos en muestras de dos WWTP en Argentina.

Dado que este trabajo se realizó conjuntamente entre los grupos pertenecientes al Laboratorio de Química Ambiental (LQA) del Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales (IANIGLA), la Universidad de Bath, Reino Unido y la Universidad de Amberes (UA), Bélgica; la parte experimental aclarará dónde se realizó cada etapa con las siguientes etiquetas: etapa realizada en Argentina (LQA) y etapa realizada en Bélgica (UA). La información sobre el análisis instrumental de las metodologías se encuentra en el anexo 2.

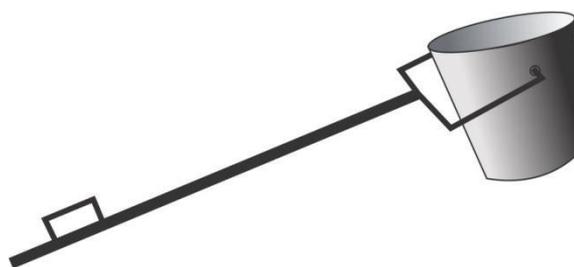
### 3.2.1 MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de aguas residuales fueron tomadas durante la temporada de invierno del 2018 (julio-agosto), asegurando no ocurran eventos de lluvia o nieve significativos para evitar cambios en el flujo de las aguas ingresantes a las WWTP [226]. Las muestras de aguas residuales se colectaron manualmente en dos WWTP de Argentina. La recolección de las muestras se realizó de forma manual cada 15 min, durante 24 horas, 7 días consecutivos. En el programa de muestreo participaron 6 integrantes del grupo del LQA, incluida la directora y además, una pasante de intercambio del proyecto INTERWASTE de la Universidad de Bath, Reino Unido. Para cubrir el muestreo se realizaron turnos rotativos cada 12 horas y una jornada de descanso, los cuales fueron cubiertos por 3 grupos de 2 personas cada uno y, además, en el laboratorio otro integrante recibía las muestras cuando terminaban los turnos y se trasladaban al laboratorio para su preservación bajo condiciones adecuadas (-4 °C). Los turnos rotativos se muestran en el siguiente esquema:

	LUN 16	MAR 17	MIE 18	JUE 19	VIE 20	SAB 21	DOM 22
<b>Día (8 a 20)</b>							
<b>Noche (20 a 8)</b>							

Para la toma de muestras se armó un dispositivo como se observa en la **Figura 16** el cual permitía coleccionar las muestras evitando estar en contacto con la misma o tener riesgo de caída en el canal de muestreo. De las muestras coleccionadas con dicho dispositivo se tomaban 50 mL con jeringa de plástico que luego eran colocados en bidones plásticos de 5 L los cuales eran mantenidos en conservadoras con hielo hasta terminar el turno de muestreo. Dichos bidones se coleccionaron por duplicado. Las muestras coleccionadas en el mismo día eran combinadas en cada bidón de 5L. Los 28 bidones (14 bidones de cada planta) se congelaron a -4 °C hasta el momento de la etapa de preparación de la muestra.

Los nombres y localidades de las plantas analizadas se mantienen anónimos debido a acuerdos de confidencialidad con el ente regulador correspondiente y en adelante, se nombrarán como planta A y planta B.



*Figura 16. Esquema del dispositivo de muestreo (muestreador) desde la entrada de la planta. El dispositivo fue armado por los integrantes del grupo de trabajo LQA y cuenta con un balde en un extremo para tomar el agua residual, desde donde luego se toman los 50 mL de muestra con la jeringa.*

Cabe destacar las medidas de higiene y seguridad que se tomaron durante todo el muestreo tanto para preservar la salud de los participantes como para preservar las muestras. Se utilizó guantes descartables que, al finalizar cada toma de muestras, se sumergían en agua con lavandina y al finalizar el turno (o antes si era necesario) se desechaban. Por otro lado, se utilizó barbijo y gafas de seguridad, como así también capucha o gorro para evitar contacto con posibles salpicaduras o vapores que se generan en la zona de muestreo. Asimismo, una vez completos los bidones, se cerraban y enjuagaban en agua con lavandina y se colocaban dentro de bolsas de residuos reforzadas para evitar contaminar la conservadora, el vehículo y el grupo que recibía las muestras. Los bidones se trasladaban en conservadoras con hielo para mantener la cadena de frío y evitar posible degradación posterior a la toma de la muestra. La ropa y el calzado usado para el muestreo fueron siempre cuidadosamente aislados en bolsas plásticas para no contaminar los vehículos ni las viviendas. Asimismo, al terminar cada jornada de trabajo, la ropa usada para el muestreo se lavaba antes de volver a usarla.

### **3.2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

(LQA) Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente en la oscuridad. Cada muestra WW se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. Las muestras se dividieron en biosólidos y sobrenadantes para determinar los PFR y sus metabolitos, respectivamente. Los biosólidos obtenidos se pesaron, liofilizaron y almacenaron a -4 °C hasta su análisis. Las masas de biosólido obtenidas para cada día en la planta A y B se encuentran detalladas en el anexo 2, sección 6.1.2.

#### *FRACCIÓN DE BIOSÓLIDOS*

(UA) La extracción y el análisis de los PFR se realizaron siguiendo el método validado previamente por Van den Eede et al. (2012) [18], el cual se encuentra detallado en el anexo 2, sección 6.1.3. Brevemente, se agregó 50 µL de IS<sub>1</sub> (TAP a 1 ng µL<sup>-1</sup>, TCEP-D<sub>12</sub>, TPhP-D<sub>15</sub> y TDCIPP-D<sub>15</sub> a 2 ng µL<sup>-1</sup>, y TBOEP-D<sub>16</sub> a 4 ng µL<sup>-1</sup>) a los biosólidos. A cada muestra de biosólido se le agregó cobre en polvo en proporción 2:1 p/p. Luego, para la lixiviación se añadió 5 mL de una mezcla de n-hexano:acetona (3:1 v/v) a la muestra de biosólido y se agitó con mezclador por vórtice durante 1 minuto. La suspensión resultante fue asistida por ondas ultrasónicas durante 5 minutos. La separación de las fases se favoreció centrifugando a 3000 rpm durante 3 min. Luego, el sobrenadante se transfirió a un tubo vacío de vidrio de 20 mL. El proceso de lixiviación se repitió en las mismas condiciones y se combinaron ambos sobrenadantes. El extracto resultante se evaporó hasta casi la sequedad mediante una corriente suave de nitrógeno a 32 °C. El extracto concentrado obtenido se solubilizó en 0,5 mL de n-hexano y se agitó con mezclador por vórtice durante 1 minuto. Para la limpieza del extracto, se utilizaron cartuchos Florisil® (500 mg, 3 mL) con 0,5 g de cobre activado en la parte superior. Los cartuchos se acondicionaron con 6 mL de acetato de etilo y 6 mL de n-hexano para activar los grupos funcionales del sorbente y humedecer el lecho de sorbente. Las muestras se cargaron en los cartuchos y los PFR se eluyeron con 10 mL de acetato de etilo. La fase orgánica obtenida se evaporó hasta casi secarse mediante una suave corriente de nitrógeno a 32 °C y se solubilizó en 50 µL de isoctano y 50 µL de RS (CB-207) y se agitó con mezclador por vórtice durante 30 s. La fase orgánica concentrada se transfirió a viales de inyección transparente de 2 mL para análisis GC/EI-MS para determinar los PFR [18].

#### *FRACCIÓN DE SOBRENADANTES*

(LQA) La extracción y el análisis de los metabolitos se realizaron siguiendo el método validado previamente por Been et al. (2017 y 2018) [19,20] el cual se encuentra detallado en el anexo 2, sección 6.1.3. Se añadió una alícuota de 50 mL de muestra WW a un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL, junto con 50 µL de IS<sub>2</sub> (DPhP-D<sub>10</sub>, TCEP-D<sub>12</sub>, BBOEHEP-D<sub>4</sub>, TBOEP-D<sub>6</sub>, 100 pg µL<sup>-1</sup>). La muestra WW se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para mejorar la separación

de fases y el sobrenadante se conservó en un tubo vacío. Se añadió una segunda alícuota WW de 50 mL al primer tubo de centrífuga que contenía los biosólidos restantes. Luego, el tubo se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se combinaron ambos sobrenadantes. Los sobrenadantes se acidificaron con HCl 6 M a pH 4-5. Luego, los cartuchos (Bond Elut-C18, 200 mg, 3 mL) se acondicionaron con 3 mL de metanol y 2 mL de agua ultrapura (pH 4-5) para activar los grupos funcionales del sorbente. Cada alícuota de 100 mL de sobrenadante acidificado se cargó en el cartucho y se eluyó bajo un vacío suave.

(UA) Luego, la elución de los metabolitos se realizó con 5 mL de metanol y la fase orgánica obtenida se agitó con mezclador por vórtice durante 20 s, y se evaporó bajo una corriente suave de N<sub>2</sub> a 37 °C. Los metabolitos se reconstituyeron con 150 µL de metanol:agua 1:1 (v/v). El extracto se transfirió a filtros de centrífuga (poro de tamaño de 0,2 µm) y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. Se inyectaron 5 µL del extracto en LC-ESI-MS/MS para determinar los metabolitos [19,20].

### 3.2.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se usó la media, mediana y rangos de concentración para describir los resultados. Los valores por debajo de los LOQ se trataron como cero para calcular las concentraciones totales de PFR y metabolitos ( $\Sigma\text{PFR}_{17}$  y  $\Sigma\text{metabolitos}_{12}$ ), medias y medianas. Se aplicó una prueba U de Mann-Whitney para comparar la concentración total de los PFR entre las plantas. La concentración total de metabolitos entre las plantas también se comparó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo. Las cargas normalizadas de población (PNL) para cada PFR y metabolito (en mg por día por 1000 habitantes) se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{CNP} \left( \frac{\text{mg}}{\text{día}} \right) \text{ cada } 1000 \text{ hab} = \frac{\text{concentración de analito} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \text{flujo} \left( \frac{\text{L}}{\text{día}} \right)}{\text{tamaño de población que sirve a la planta}} \times 1000$$

Las concentraciones de PFR y metabolitos medidas se multiplicaron por los flujos correspondientes y luego se dividieron por el tamaño de la población atendida por la WWTP correspondiente [87].

### 3.3.1 CONCENTRACIÓN DE PFR Y PLASTIFICANTES EN LA FRACCIÓN DE BIOSÓLIDOS

La frecuencia de detección, la media, la mediana, el rango (mín-máx) y el error estándar de los PFR individuales se enumeran en la **Tabla 17**. Tres de los diecisiete PFR analizados (a saber, T2IPPP, T35DMPP y B4IPPPP) se encontraron en niveles de concentración <LOQ. En particular, TOTP y TPTP solo se detectaron en WWTP A, mientras que TnBP solo se detectó en WWTP B.

El analito EHDPP fue el PFR más abundante en las plantas analizadas (249 y 189 ng g<sup>-1</sup> p.s. para WWTP A y B, respectivamente), seguido de TBEP (188 y 109 ng g<sup>-1</sup> p.s. para WWTP A y B, respectivamente) y TPhP (96,9 y 86,1 ng g<sup>-1</sup> p.s. para WWTP A y B, respectivamente). El resto de los PFR (TEHP, TPP, TCEP, TCIPP, TOTP, TMTP, TPTP, 2IPPDPP, 4IPPDPP y TDCIPP) se encontraron en el rango de no detectado–43,9 ng g<sup>-1</sup> p.s.

El PFR más abundante (EHDPP) se utiliza principalmente como retardante de llama/plastificante en PVC flexibles y también se agrega a otros polímeros y copolímeros (por ejemplo, copolímeros de PVC, celulosa y copolímeros de celulosa, metacrilato de polimetilo y poliestireno) y también se puede encontrar en cauchos, películas fotográficas, pinturas,

dispersantes de pigmentos, adhesivos, recubrimientos textiles y películas para envasado de alimentos [227]. El segundo PFR más abundante (TBOEP) se usa predominantemente en pulido de pisos y lacas [228], mientras que TPhP se usa como un plastificante importante en televisores LCD, computadoras portátiles y enchufes [78].

La concentración total de  $\sum\text{PFR}_{17}$  (en adelante, la carga total de PFR) fue 702 y 691 ng g<sup>-1</sup> p.s. para la WWTP A y B, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre la carga total de PFR para WWTP A y WWTP B ( $p=0,848$ ). La contribución (en porcentaje) de cada PFR a la carga total de PFR en la WWTP A y B se muestra en la **Figura 16.A**. El analito EHDPP contribuyó con un 35% y 27% a la carga total de PFR en WWTP A y B, respectivamente. El analito TnBP contribuyó con un 22% a la carga total de PFR en la WWTP B, mientras que se encontró por debajo del LOQ en la WWTP A. Finalmente, TBEP contribuyó con un 27% y 16% a la carga total de PFR en la WWTP A y B, respectivamente.

Las diferencias no significativas ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney) de la carga total de PFR entre las WWTP aquí estudiadas pueden deberse al hecho de que ambas reciben aguas residuales del mismo tamaño de población (349919 y 350015 habitantes para la WWTP A y B, respectivamente) con una contribución del 76% doméstico y 6% industrial para la WWTP A y 70% doméstico y 4% industrial para la WWTP B.

### **3.3.2 CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS DE PFR EN LA FRACCIÓN DE SOBRENADANTES**

La frecuencia de detección, la media, la mediana, el rango (mín-máx) y el error estándar de los metabolitos individuales se enumeran en la **Tabla 18**. Tres de los doce metabolitos analizados (a saber, BCIPP, 4-HO-DPHP y 5-HO-EHDPHP) se encontraron en niveles de concentración por debajo del LOQ.

El metabolito BBOEP fue el más abundante en las WWTP analizadas (112 y 102 ng L<sup>-1</sup> p.h., para WWTP A y B, respectivamente), seguido de EHPHP (55,8 y 75,2 ng L<sup>-1</sup> p.h. para WWTP A y B, respectivamente) y DnBP (59,1 y 65,5 ng L<sup>-1</sup> p.h. para WWTP A y B, respectivamente). Los metabolitos DPhP, BCEP, BBOEHEP y 3-OH-TBOEP se encontraron en el rango de 5,64–13,0 ng L<sup>-1</sup> p.h., y los metabolitos BDCIPP y BCIPHIPP se encontraron en el rango de 0,16–2,09 ng L<sup>-1</sup> p.h.

La concentración total de los  $\sum\text{metabolitos}_{12}$  (en adelante, la carga total de metabolitos) fue 365 y 392 ng L<sup>-1</sup> p.h. para la WWTP A y B, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre la carga total de metabolitos entre las dos WWTP aquí estudiadas ( $p=0,931$ ). La **Figura 16.B** muestra la contribución de cada metabolito a la carga total de metabolitos en la

WWTP A y la WWTP B. El metabolito BBOEP contribuyó con un 31 y 26% a la carga total de metabolitos en la WWTP A y B, respectivamente. El metabolito EHPHP contribuyó con un 15% y 19% a la carga total de metabolitos en la WWTP A y B, respectivamente. El metabolito DnBP contribuyó con 16% y 17% a la carga total de metabolitos en WWTP A y WWTP B, respectivamente.

Como se indicó anteriormente para los resultados de PFR (ver el último párrafo, sección 4.3.1.), la misma explicación plausible se ofrece aquí con respecto al tamaño de la población también, y puede ayudar a explicar la falta de diferencias significativas en la carga total de metabolitos entre los dos WWTP aquí estudiados.

A.

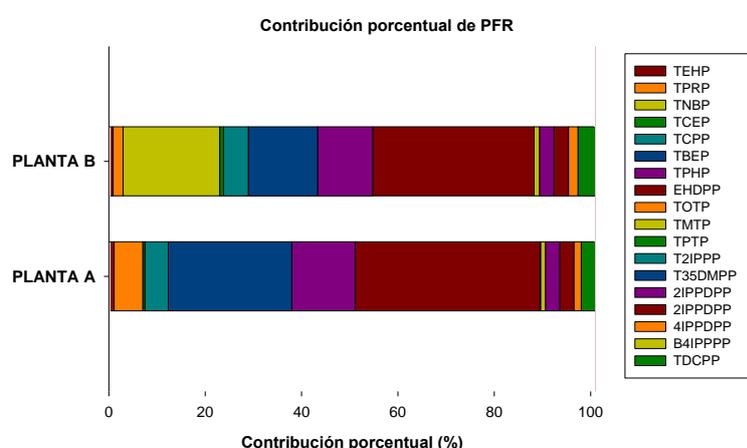


Figura 17. Gráficas de la contribución porcentual de los analitos de cada grupo a cada planta (A y B). A: PFR, B. sus metabolitos.

B.

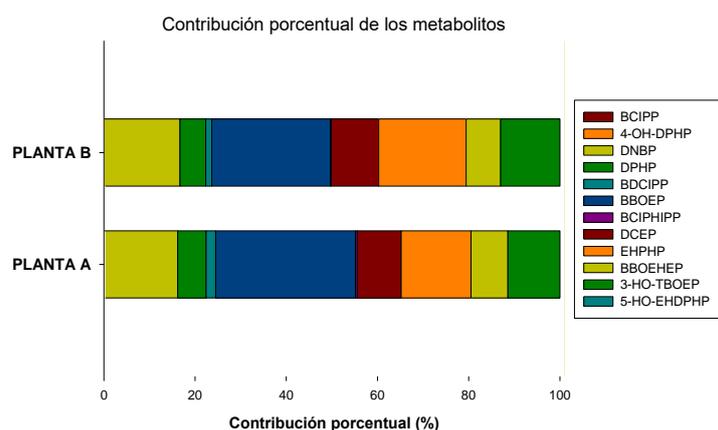


Tabla 17. Media, mediana (entre paréntesis), error estándar y concentración mín-máx de los PFR en las WWTP A y B del oasis urbano occidental de Argentina.

PFR (ng g <sup>-1</sup> )	WWTP A (n=7 días)					WWTP B (n=7 días)				
	Media (FD <sup>42</sup> )	(Mediana )	SE <sup>43</sup>	Min	Max	Media (FD)	(Mediana )	SE	Min	Max
TEHP	8,04 (43%)		15,8	<LOQ	43,2	6,60 (57%)	(3,83)	8,77	<LOQ	20,7
TPP	43,9 (29%)		102	<LOQ	273	15,7 (86%)	(15,5)	11,9	<LOQ	27,3
TnBP	ND					152 (100%)	(155)	13,8	123	163
EHDPP	249 (100%)	(239)	30,1	211	296	189 (100%)	(182)	30,2	155	250
TCEP	3,17(100%)	(2,86)	0,73	2,10	4,19	5,77 (100%)	(4,81)	3,80	3,26	14,3
TCPP	35,7 (100%)	(36,0)	9,23	22,2	44,6	39,2 (100%)	(38,3)	5,65	32,4	49,0
TBEP	189 (100%)	(164)	78,6	89,4	298	109 (100%)	(89,6)	66,6	35,8	222
TPhP	96,9 (100%)	(83,5)	41,3	68,4	188	86,1 (100%)	(80,8)	8,86	78,1	99,5
TOTP	0,97 (29%)		1,80	<LOQ	4,60	ND				
TMTp	7,11 (100%)	(7,60)	1,93	4,60	9,70	8,66 (100%)	(6,50)	5,77	4,00	20,8
TPTP	0,39 (14%)		1,02	<LOQ	2,70	ND				
T2IPPP	ND					ND				
T35DMPP	ND					ND				
2IPPDPP	21,7 (100%)	(19,4)	11,9	1,90	41,1	22,5 (100%)	(23,0)	1,81	19,1	24,5
4IPPDPP	10,9 (100%)	(11,4)	2,74	6,90	14,5	15,0 (100%)	(15,7)	1,38	12,6	16,3
B4IPPPP	ND					ND				
TDCPP	36,1 (100%)	(35,6)	5,40	30,2	44,5	42,3 (100%)	(39,7)	7,76	31,2	53,7
$\Sigma PFR_{17}$	702					691				

<sup>42</sup> DF: frecuencia de detección

<sup>43</sup> Standard error (error estándar)

Tabla 18. Media, mediana (entre paréntesis), error estándar y concentración mín-máx de los metabolitos en las WWTP A y B del oasis urbano occidental de Argentina.

Metabolitos (ng L <sup>-1</sup> )	WWTP A (7 días)					WWTP B (7 días)				
	Media (FD <sup>44</sup> )	(Mediana )	SE <sup>45</sup>	Min	Max	Media (FD)	(Mediana )	SE	Min	Max
<b>BCIPP</b>	ND					ND				
<b>4-HO-DPHP</b>	ND					ND				
<b>DnBP</b>	59,1 (100%)	(54,4)	19,8	39,7	101	65,5 (100%)	(60,4)	15,7	44,4	94,3
<b>DPhP</b>	22,7 (100%)	(22,8)	2,73	18,8	26,0	22,1 (100%)	(23,2)	2,71	18,9	25,6
<b>BDCIPP</b>	7,6 (100%)	(6,50)	2,39	5,19	12,2	5,20 (100%)	(5,30)	1,46	3,50	7,54
<b>BBOEP</b>	112 (100%)	(115)	16,1	88,9	137	102 (100%)	(106)	16,3	78,3	123
<b>BCIPHIPP</b>	4,8 (100%)	(4,80)	0,03	<LOQ	4,80	4,40 (100%)	(4,40)		<LOQ	4,35
<b>BCEP</b>	35,1 (100%)	(35,0)	3,94	30,6	40,2	40,9 (100%)	(39,1)	15,7	32,2	49,4
<b>EHPHP</b>	55,8 (100%)	(55,4)	7,41	49,0	66,5	75,2 (100%)	(69,1)	2,71	66,8	109
<b>BBOEHEP</b>	29,6 (100%)	(30,4)	3,56	24,8	34,4	29,6 (100%)	(31,3)	1,46	17,8	40,6
<b>3-HO-TBOEP</b>	41,6 (100%)	(55,3)	30,3	6,21	74,8	51,1 (100%)	(64,0)	16,3	12,5	73,6
<b>5-HO-EHDPhP</b>	ND					ND				
<b>Σmetabolitos<sub>12</sub></b>	365					392				

ΣPFR= sumatoria total de las medias de TEHP, TPrP, TnBP, TCPP, TBEP, TPHP, EHDPP, TOTP, TMTP, TPTP, T2IPPP, T35DMPP, 2IPPDPP, 4IPPDPP, B4IPPPP y TDCPP; Σmetabolitos= sumatoria total de las medias de BCIPP, 4-OH-DPHP, DnBP, DPHP, BDCIPP, BBOEP, BCIPHIPP, DCEP, EHPHP, BBOEHEP, 3-HO-TBOEP, 5-HO-EHDPHP; <LOQ: por debajo de los límites de cuantificación; Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre plantas para la sumatoria de las concentraciones (\*  $p < 0,05$ ; ns: no significativo, prueba U de Mann-Whitney). La contribución relativa (%) de cada PFR a la ΣPFR y de cada metabolito a la Σmetabolitos para cada planta se proporciona entre paréntesis.

<sup>44</sup> DF: frecuencia de detección

<sup>45</sup> Standard error(error estándar)

### 3.3.3 CARGA NORMALIZADA DE LA POBLACIÓN

Dado que la carga de población normalizada (PNL) es un dato estandarizado, es una herramienta estadística esencial al hacer comparaciones de tiempo espacial entre las WWTP [87]. Las PNL para compuestos de PFR (**Tabla 19.A**) variaron desde <LOD hasta 29,6 mg día<sup>-1</sup> (1000 hab<sup>-1</sup>).

La PNL para los metabolitos (**Tabla 19.B**) varió desde <LOD hasta 51,7 mg día<sup>-1</sup> (1000 hab<sup>-1</sup>). Con respecto a los estudios actuales de la aparición de PFR y metabolitos en muestras mundiales de WW; este es el primer estudio realizado que informa sobre PFR y metabolitos en Argentina. En las WWTP europeas, se han informado recientemente PNL espacio-temporal durante el período 2016-2017 [87]. En ese estudio, los autores encontraron que la PNL de los metabolitos estaba dentro del rango de <1 a 800 mg día<sup>-1</sup> (1000 hab<sup>-1</sup>) en las WWTP de las ciudades de Amberes, Bruselas, Atenas, Ginebra y Vilna [87]. Los valores de PNL informados en Europa fueron 5 a 10 veces mayor que los obtenidos en el presente sitio de estudio (oeste de Argentina).

**3.4 CO**

**NC**

**LU**

**SIO**

**NE**

**S**

**PA**

**RCI**

**AL**

**ES**

El presente estudio informó la aparición de PFR y sus metabolitos en muestras de WW de las WWTP en Argentina. Los PFR y sus metabolitos se detectaron dentro del rango de no detectado a 249 y 112 ng g<sup>-1</sup> p.s., respectivamente, para cada WWTP. En las dos WWTP aquí estudiadas, los tres PFR más abundantes fueron EHDPP, TBEP y TPhP y los tres metabolitos más abundantes fueron BBOEP, DnBP y EHPHP. Ambas plantas, A y B, tenían las mismas cargas normalizadas de la población de PFR y sus metabolitos, y es posible que esto se deba al tamaño de la población que contribuye a la planta A sea la misma que la de la planta B, por lo tanto, tienen descargas antropogénicas similares.

La aparición de PFR y sus metabolitos se estudió por primera vez en Argentina. Dado que no hay información sobre la presencia de PFR y sus metabolitos, tanto en muestras bióticas ni abióticas de América del Sur, el presente estudio representa un inicio en la determinación de estos contaminantes emergentes en esta región del mundo. Las evaluaciones futuras de PFR y metabolitos podrían mejorarse si se consideran las todas WWTP de Argentina y los países vecinos, lo que permite una investigación más sólida sobre el uso y la liberación de estos contaminantes emergentes.

Tabla 19. Carga normalizada de la población en mg por día cada 1000 habitantes.

A. PFR ( $\text{mg día}^{-1} (1000 \text{ hab})^{-1}$ )

	TEHP	TPP	TnBP	TCEP	TCPP	TBEP	TPHP	EHDPP	TOTP	TMTP	2IPDPP	4IPDPP	TDCPP
<b>WWTP A</b>				0,08	1,15	5,00	2,47	6,14		0,17	0,63	0,45	1,13
		0,22		0,12	1,42	5,27	3,04	6,82	0,15	0,20	1,33	0,30	1,24
				0,15	1,57	10,5	6,62	9,49	0,08	0,17	0,99	0,47	1,56
		1,45	9,15	0,10	1,46	4,81	2,52	19,7		0,27	0,64	0,29	1,01
				0,09	0,79	6,03	2,36	7,81		0,27	0,06	0,35	0,97
		0,21	1,11	0,12	0,72	2,92	2,98	8,28		0,32	0,82	0,23	1,33
<b>WWTP B</b>				0,08	1,09	8,34	2,41	6,49		0,22	0,56	0,42	1,03
			8,66	0,76	2,20	2,20	4,22	6,56		0,21	1,22	0,67	2,06
		0,94	1,44	8,36	0,20	2,03	1,93	5,35	29,6	0,35	1,03	0,85	2,01
		1,22		9,58	0,19	1,91	8,43	4,60	23,9	0,54	1,28	0,92	1,84
			1,10	9,13	0,29	3,12	11,0	6,02	11,2	0,72	1,75	1,18	4,00
		0,25	1,63	8,87	0,29	2,93	5,35	4,70	9,94	0,35	1,45	0,81	2,37
	0,25	1,69	10,3	0,33	2,21	5,29	6,07	11,8	0,30	1,46	1,08	3,29	
		0,81	7,97	0,28	2,00	11,6	4,91	10,1	1,08	1,28	0,79	2,36	

*B. metabolitos de PFR (mg día<sup>-1</sup> (1000 hab)<sup>-1</sup>)*

	<b>DnBP</b>	<b>DPhP</b>	<b>BDCIPP</b>	<b>BBOEP</b>	<b>BCIPHIPP</b>	<b>BCEP</b>	<b>EHPHP</b>	<b>BBOEHEP</b>	<b>3-HO-TBOEP</b>
<b>WWTP 1</b>	37,0	8,58	2,25	42,4	1,74	11,4	20,2	11,1	3,82
	14,6	6,93	2,40	32,7		12,9	18,0	9,89	20,3
	19,6	7,92	3,37	41,6		11,5	20,3	12,4	21,9
	22,6	7,34	2,77	41,3		14,1	24,4	11,2	25,8
	19,5	8,25	2,29	43,4	1,74	11,1	17,9	9,69	4,84
	17,1	9,18	1,84	33,4		14,3	17,5	8,79	2,20
	19,9	9,45	4,41	49,7		13,9	23,6	12,0	27,1
<b>WWTP 2</b>	26,8	8,36	2,57	38,6		17,3	30,9	9,66	18,1
	31,7	10,9	2,36	47,0		21,5	29,6	13,0	5,52
	25,9	8,55	1,54	47,6	1,92	14,9	33,3	18,0	31,8
	41,3	11,2	1,69	54,0		19,9	30,2	15,0	28,0
	19,3	10,1	1,77	34,0		14,0	29,9	7,73	11,7
	31,2	10,2	3,31	51,7		21,7	47,9	13,7	32,3
	25,4	8,76	2,74	41,6		16,5	29,4	14,0	29,7

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## CONCLUSIONES GENERALES

Las metodologías analíticas de preparación de muestras desarrolladas en la presente Tesis Doctoral resultaron ser eficientes, simples, rápidas y amigables con el ambiente.

El acoplamiento de las técnicas ED-SA-DLLME propuesta como metodología de preparación de muestras para determinar PBDE en muestras de cabello humano por GC-ECD resultó ser eficiente, simple, rápida y verde. El uso de herramientas quimiométricas como el diseño experimental y la optimización por respuesta múltiple demostró ser de gran ayuda para lograr una optimización eficiente y rápida de las condiciones de extracción dado que no sólo muestran los efectos de las variables individuales, sino también de sus interacciones, disminuyen el número de ensayos y economizan la metodología. La comparación de la metodología ED-SA-DLLME con otras metodologías analíticas para determinar PBDE en muestras de cabello humano reveló que las cifras de mérito analítico obtenidas son comparables con las reportadas y presentó ventajas tales como reemplazo de solventes polares como acetonitrilo, acetona o metanol por el tensioactivo SDS, disminución de las temperaturas y tiempos de digestión en la etapa de digestión enzimática, haciendo que la misma sea más verde que las digestiones convencionales (digestión ácida o básica) y disminución del tiempo y el solvente de extracción en la etapa de SA-DLLME. Los LOD y LOQ obtenidos en la metodología ED-SA-DLLME-GC-ECD fueron en el orden de los picogramos por gramo y los nanogramos por gramo, respectivamente.

La metodología de preparación de muestras, cop-CAE para determinar OP en muestras de agua por HPLC-UV, resultó ser una metodología amigable con el ambiente dado que no se utilizaron grandes volúmenes de solventes orgánicos (sólo 300  $\mu$ L de metanol en la etapa de acondicionamiento previo a la inyección en HPLC-UV) en la etapa de la preparación de muestras. La metodología resultó ser eficiente, rápida y simple y puede ser aplicada al análisis de muestras reales en cualquier laboratorio químico dado que a lo largo de la metodología de preparación de muestras se utilizó instrumental simple como un mezclador por vórtice y balanzas analíticas. Los ensayos evidenciaron que tanto el SDS como el agente de coprecipitación, por separado, no fueron capaces de extraer de manera eficiente a los OP, por lo que, la combinación del SDS como agente extractivo junto con el agente precipitante en la metodología de preparación de muestras para determinar OP en distintas muestras de agua, mejoró la eficiencia de extracción de los OP. Los resultados demostraron que realizar una extracción coacervativa que esté asistida por coprecipitación es más eficiente que aplicar sólo la CAE. La comparación de la metodología de preparación de muestras cop-CAE con otras metodologías analíticas para determinar OP en muestras de agua reveló que las cifras de mérito analítico obtenidas son comparables, obteniendo LOD y LOQ en el orden de los nanogramos por mililitro.

Por otro lado, por primera vez, se estudió la ocurrencia de los novedosos PFR y sus metabolitos en Argentina. El estudio de la ocurrencia de los PFR y sus metabolitos a través de las muestras de aguas residuales, demostró que Argentina tiene niveles de concentración en un orden de magnitud menor que los reportados en Europa (Bélgica y Grecia, entre otros).

El trabajo basado en el estudio de la ocurrencia de los PFR y sus metabolitos fue desarrollado en el marco del proyecto INTERWASTE. Cabe destacar que la participación en este proyecto fue beneficiosa no sólo para la tesista sino para el grupo en general. La estancia de investigación en Bélgica permitió realizar la preparación de muestras de los biósólidos y sobrenadantes obtenidos de las aguas residuales y determinación de los PFR y sus metabolitos por GC-MS/MS y LC-MS/MS permitiendo concluir con el estudio de la ocurrencia de estos compuestos encontrados en Argentina. Se adquirió experiencia adicional en las técnicas de preparación de muestras para determinar PFR y sus metabolitos en muestras acuosas y sólidas (sobrenadantes, biosólidos y peces liofilizados), se intercambió conocimiento sobre equipamiento analítico entre colegas, y técnicas de preparación de muestras practicadas anteriormente, pero con un manejo diferente en el laboratorio y se adquirió experiencia con el uso del software asociado a estos equipos instrumentales de alta complejidad.

Trabajo en colaboración con el LQA: la combinación de técnicas verdes UAE-CPE-UABE para determinar PBDE demostró ser eficiente y simple, aplicando una etapa extra de limpieza del extracto novedosa como lo es la técnica UABE. La metodología propuesta extrajo eficientemente a los PBDE de la matriz de leche materna evitando realizar etapas de saponificación las cuales utilizan reactivos corrosivos y son muy agresivas. Los LOD y LOQ obtenidos para la metodología propuesta fueron en el orden de los nanogramos por gramo, convirtiéndola en metodologías simples aplicables al análisis de muestras del mundo real.

Resulta importante remarcar la diferencia entre las técnicas cop-CAE y CPE. En la técnica de cop-CAE se utilizan tensioactivos iónicos (catiónicos o aniónicos) que son independientes de la temperatura. En la técnica CPE, el tensioactivo es dependiente de la temperatura y para lograr alcanzar su CMC puede necesitar periodos muy largos bajo altas temperaturas dependiendo del tensioactivo elegido. La aplicación de cop-CAE a analitos termolábiles es más ventajosa que aplicar CPE dado que no se corre el riesgo de degradar los analitos. Asimismo, dado que los OP se determinaron en HPLC-UV, fue conveniente el uso del SDS porque, a diferencia de los tensioactivos no iónicos, los iónicos no suelen tener un fuerte cromóforo absorbente en su molécula que interfiera en la detección por UV. Asimismo, existen diferencias marcables entre las etapas de limpieza con el uso de sílica ácida y con ondas ultrasónicas. En el caso de la etapa de limpieza realizada para los extractos obtenidos del cabello, el solvente extractivo es miscible con aquellos solventes que pueden ser inyectados en GC-ECD pero incompatible con el equipo,

por lo que era necesario realizar un cambio de solvente por medio de cartuchos. Por otro lado, el extracto obtenido de la leche materna era el tensioactivo Tritón X-114, el cual es totalmente incompatible con GC-ECD, por lo que también era necesario un cambio de solvente. En este caso, se pudo aplicar un cambio de solvente mediante UABE sin necesidad de recurrir a los cartuchos con sorbentes dado que el tensioactivo y el isoctano no son miscibles. Asimismo, de la técnica de cop-CAE, se obtuvo también un extracto basado en tensioactivo SDS, pero la diferencia se radicó en que agregando sólo unos microlitros de algún solvente polar (metanol o acetonitrilo) el coacervato puede ser inyectado en un HPLC-UV.

Las 3 metodologías de preparación de muestras propuestas permitieron obtener información sobre los niveles de concentración de los PBDE y OP en las distintas muestras de Mendoza. Hasta el momento, no hay información disponible sobre los niveles de concentración de PBDE en muestras de cabello humano y leche materna en Argentina. Si bien los PBDE ya han sido determinados previamente en estas muestras humanas en otros países, fue la primera vez que se determinaron en Argentina. Los resultados arrojaron niveles bajos de concentración de PBDE (<LOQ para muestras de leche materna y entre 0,01-0,07 ng g<sup>-1</sup> para cabello humano), encontrándose muy por debajo de la media de concentración hallada alrededor del mundo (entre 0,56-1000 ng g<sup>-1</sup> para leche materna y entre 3,2-2220 ng g<sup>-1</sup> para cabello humano).

Finalmente, los resultados hallados en la determinación de OP en muestras de agua demostraron que Mendoza presenta niveles de concentración de CPF y MTD 5,5 y 4,6 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos pesticidas son muy poco estudiados en la literatura dado que son mayormente utilizados en los cultivos de Mendoza (a excepción de CPF que es más utilizado en otros países), por lo que sólo se pudieron comparar con otro estudio de la ocurrencia de OP realizados en Neuquén, donde se determinó el pesticida CPF por debajo de los valores de LOQ en muestras de agua superficial.

## **ANEXOS**

## 1.4 ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE PBDE EN MUESTRAS DE LECHE HUMANA

### Aportes novedosos y destacados del anexo 1:

- La combinación de UAE-CPE-UABE mejoran la eficiencia de extracción de los PBDE en muestras de leche.
- La metodología verde propuesta expande el uso de la CPE para muestras biológicas por GC-ECD.
- La metodología CPE-UABE genera extractos limpios adecuados para GC-ECD, sin necesidad de una etapa adicional de limpieza.
- Los PBDE fueron determinados por primera vez en muestras de leche humana en Argentina.

### 4.1 Intr

odu

cci

ón

Los efectos toxicológicos de los PBDE en la salud humana siguen siendo un punto importante de estudio considerando sus efectos adversos en el sistema nervioso, reproductivo y endócrino. Continuando el estudio de las muestras biológicas no invasivas para monitorear PBDE en humanos, la leche materna se puede utilizar como un indicador de la exposición a los PBDE no sólo de las madres, sino también de los infantes, ya que su ingesta está directamente relacionada [41].

Dado que la matriz de leche es compleja, resulta necesario desarrollar una metodología de preparación de muestras que disminuya o elimine el efecto matriz aportado por las biomoléculas presentes y que extraiga eficientemente a los PBDE.

Se ha reportado el uso de la técnica de extracción CPE para la extracción y preconcentración de contaminantes orgánicos en muestras ambientales (sedimentos [229,230]) y biológicas (suero humano [231] y leche [232]) antes del análisis por HPLC-UV y HPLC-FD. Aunque las metodologías informadas hasta la fecha mostraron una aplicación eficiente para el análisis por HPLC, esto no implica una limpieza suficiente para el análisis de matrices complejas por GC. Trabajos previos del grupo LQA propusieron la metodología de extracción CPE-UABE previo al

análisis por GC para extraer y aislar PBDE de agua y, se analizaron muestras de suelo con resultados deficientes (valores de recuperación  $\leq 20\%$ ) [6]. Sobre la base de estas evidencias, se planteó la hipótesis de que una etapa de lixiviación de las muestras biológicas antes de la CPE para determinar PBDE mejoraría el rendimiento de la metodología analítica. Por lo tanto, se propuso la combinación de tres técnicas de extracción verdes consecutivas para la lixiviación, extracción, limpieza y preconcentración de PBDE en muestras de leche antes de la determinación por GC-ECD. Para el objetivo de este capítulo, se seleccionaron los 4 PBDE más comúnmente encontrados en muestras ambientales: BDE-47, BDE-99, BDE-100 y BDE-153. Se utilizó un método multivariado para comprender y optimizar el efecto de cada variable, así como sus interacciones [176], en la respuesta analítica de los PBDE. El rendimiento analítico de la metodología UAE-CPE-UABE-GC-ECD se evaluó en términos de LOD, repetibilidad, recuperación (%) y rango de trabajo lineal. En este trabajo, se determinó 4 PBDE (-47, -100, -99 y -153), por primera vez, en muestras de leche materna de mujeres Argentinas.

## 4.2 Exp

eri

me

ntal

### 4.2.1 *Reactivos y solventes*

Los estándares comerciales de PBDE que se utilizaron son: BDE-47, BDE-99, BDE-100 y BDE-153, a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  en isoctano (Accustandard, New Haven, CT, Estados Unidos). Se usó bifenilo de decacloro (PCB-209) como estándar interno a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  en isoctano (Chem-Lab, Zedelgem, Bélgica). Los estándares de PBDE se conservaron en oscuridad y a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las futuras soluciones de PBDE e IS se prepararon en isoctano y por separado, en concentraciones de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  y  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectivamente, y conservadas en viales color caramelo a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Asimismo, se adquirió acetona, tolueno, isoctano y acetato de etilo en Tedia (Fairfield, OH, Estados Unidos). Por otro lado, DCM, n-hexano y MeOH se adquirieron en Center Valley (PA, Estados Unidos). Se prepararon soluciones acuosas de  $100 \text{ g L}^{-1}$  Tritón X-114 (Sigma, Milwaukee, Estados Unidos)  $359 \text{ g L}^{-1}$  NaCl (Sigma Aldrich, Alemania) en agua ultrapura. El agua ultrapura se obtuvo del sistema de purificación de agua Milli-Q ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Millipore, París, Francia). Todos los reactivos y solvente fueron de grado analítico o superior.

#### **4.2.2 Cromatógrafo de gases con detección por captura de electrones**

La determinación de BDE-47, -99, -100 y -153 en muestras de leche se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 (Series II) equipado con un detector de captura de electrones (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA). Las condiciones utilizadas y las temperaturas son las reportadas en el capítulo II, sección 2.2.2. para la determinación de PBDE en muestras de cabello humano.

#### **4.2.3 Muestreo y acondicionamiento de las muestras**

En este capítulo, se analizó leche humana y leche en polvo comercial. La leche humana se recolectó con un extractor de leche en un recipiente de vidrio de 2 madres voluntarias de nuestro grupo (Mendoza, Argentina) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Las muestras fueron liofilizadas obteniendo 30,5 g de muestra seca a partir de 30 mL de muestra líquida. Las muestras de leche en polvo se adquirieron en un supermercado local (Mendoza, Argentina). Para los ensayos de optimización, a 0,5 g de muestra seca de leche (libre de PBDE) se le adicionó 5 ng g<sup>-1</sup> finales de PBDE.

#### **4.2.4 Preparación de las muestras**

Los 4 PBDE se lixiviaron de una muestra de 0,5 g de leche seca con 1,75 mL de una mezcla de solventes acetona:n-hexano (30:70 v/v). El proceso fue asistido por ultrasonido a temperatura ambiente mediante la aplicación de 3 ciclos de 8,2 minutos de duración con 1 minutos de descanso en el medio. Después de la lixiviación, la suspensión resultante se centrifugó a 3500 rpm (2800 x g) durante 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo vacío y limpio de 10 mL. El procedimiento de lixiviación se repitió en las mismas condiciones y los dos extractos se combinaron. El lixiviado se evaporó hasta sequedad bajo una suave corriente de nitrógeno, evitando el secado excesivo del tubo. El extracto seco se reconstituyó con 5 mL de agua ultrapura y se agregaron 0,5 mL de Triton X-114 1% (p/v) y 0,56 mL de NaCl 4% (p/v) y se mezclaron con un mezclador por vórtice. El tubo de centrifuga se termostató a 55 °C durante 10 min. En estas condiciones, el sistema alcanzó el punto de nube y la fase de coacervado comenzó a separarse del volumen acuoso. El tubo se centrifugó a 3500 rpm (2800 x g) durante 10 minutos para acelerar la decantación de la fase micelar. El tubo de centrifuga se refrigeró (5 °C) durante la centrifugación. El sobrenadante acuoso se eliminó manualmente. La retro-extracción asistida por ultrasonido se llevó a cabo mediante la adición de 90 µL de isoctano a la fase rica en tensioactivo resultante y se sonicó a 40 °C durante 3 min. Luego se inyectó un microlitro de la fase de isoctano en el GC-ECD para su análisis. La **Figura 18** muestra el esquema de la metodología analítica desarrollada.

#### **4.2.5 *Diseño experimental y optimización de las variables que afectan al sistema***

La optimización de la lixiviación, extracción y retro-extracción estudiaron por separado. Primero, se usó un diseño experimental factorial ( $2^k$ ) para evaluar la importancia de las variables, así como las interacciones que gobiernan cada técnica en las respuestas analíticas. Las condiciones de trabajo se eligieron en base al conocimiento de los ensayos preliminares [6,233]. Después de la regresión lineal múltiple y el análisis de varianza, se utilizaron las gráficas de Pareto para seleccionar las variables significativas [176]. Una vez seleccionadas las variables que influyen en las técnicas, se llevó a cabo un Diseño Central Compuesto para identificar aquellas condiciones que condujeron a las respuestas analíticas máximas de PBDE y predecir matemáticamente cómo las respuestas analíticas se relacionaron con los valores de la variable de trabajo [178]. Los valores atípicos se eliminaron mediante el análisis de la diferencia entre la prueba de valores ajustados (DFFITS), debido a su influencia desproporcionada en la respuesta predicha, y por lo tanto en el modelo [176]. Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple y se validaron mediante el análisis de varianza. Finalmente, se utilizó un criterio de respuesta múltiple, la función de deseabilidad (D), para encontrar los valores que conducen a la mejor respuesta analítica para los PBDE estudiados[179].

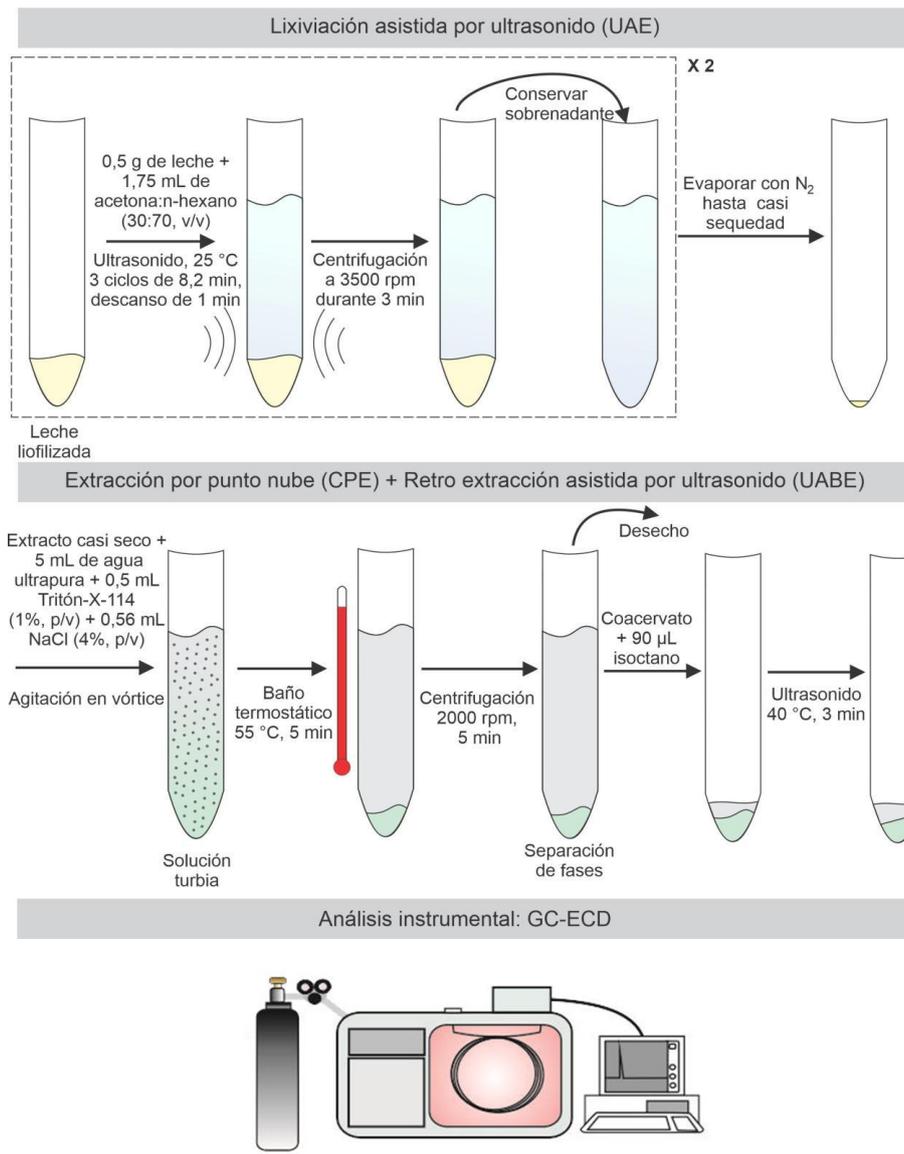


Figura 18. Esquema de los pasos de la metodología analítica desarrollada para la determinación de PBDE en muestras de leche mediante UAE-CPE-UABE-GC-ECD.

## 4.3 Resultados y discusión

La eficiencia de la extracción de la metodología propuesta está condicionada por la transferencia de masa de los analitos a través de las diferentes etapas de la metodología UAE-CPE-UABE, así como por otros factores incluyendo la disponibilidad de los analitos y la compatibilidad entre las técnicas. Aunque hay incluidas varias técnicas en la metodología de preparación de muestras, el estudio y la optimización de toda la metodología analítica es compleja. El análisis estadístico multivariado se usó para identificar aquellas variables que afectan significativamente a cada técnica y para optimizar las condiciones de trabajo que llevan a una mejora máxima del factor de las señales analíticas de los analitos dentro de un tiempo de preparación de la muestra más corto.

El desarrollo de un método analítico usando soluciones sintéticas y testeando su futura aplicación en muestras reales generalmente requiere varios ajustes para lograr un desempeño satisfactorio. El uso de una matriz biológica a lo largo del proceso es una elección conveniente para evitar futuros ajustes cuando se aplique al análisis de muestras reales. Por lo tanto, se consideró la señal mejorada debido al perfeccionamiento de la eficiencia de la extracción así como un análisis cromatográfico satisfactorio. Estos aspectos finalmente determinaron la sensibilidad y selectividad de la metodología analítica resultante. En este sentido, cada etapa analítica (UAE, CPE, UABE) fue estudiada y optimizada usando leche comercial libre de PBDE, con adición de 5 ng g<sup>-1</sup> de la mezcla de PBDE. La influencia de las variables experimentales sobre el desempeño de la propuesta metodología de preparación de muestras se investigó y optimizó sobre la respuesta relativa de la señal analítica de los PBDE estudiados.

#### 4.3.1 Tipo de solvente de lixiviación para la extracción asistida por ultrasonido

Basado en trabajos previos, el primer enfoque fue realizar la técnica de CPE directamente sobre las muestras de leche líquidas, seguido de una técnica de UABE con isoctano previo al análisis por GC-ECD. Algo similar a las muestras de suelo, ocurrió con las muestras de leche, obteniendo valores de recuperación muy bajos, aproximados al 20% [6], para los 4 PBDE en estudio. La recuperación alcanzada podría deberse a la complejidad de la matriz de la muestra biológica.

La leche humana contiene alrededor de 3-7% de lípidos, los cuales se emulsifican como membrana de los glóbulos de grasa de la leche o MFGM (del inglés *milk fat globule membranes*) [234]. Los MFGM consisten en una capa interna de lipoproteínas desestructuradas, mientras que en la capa externa de los MFGM está compuesta por una membrana trilaminar que consiste de fosfolípidos, proteínas y triglicéridos con estructura de mosaico fluido [234,235]. Considerando las características de las muestras de leche, es esperable que los PBDE estén asociados a los lípidos triglicéridos presentes en los MFGM debido a su carácter no polar [110].

La UAE se eligió como técnica de lixiviación frente a otras técnicas tradicionales de extracción tales como la extracción Soxhlet, ya que ofrece una alternativa rápida, eficiente y requiere un consumo mínimo de solvente. Previo al diseño experimental, se llevó a cabo un estudio preliminar para definir el solvente más adecuado para la lixiviación en UAE considerando los analitos y las particularidades de la matriz. Se evaluaron distintos solventes orgánicos, generalmente utilizados para extraer PBDE, tales como hexano, DCM, acetonitrilo, acetona y combinación de estos. Los ensayos se realizaron por triplicado seguido de la metodología analítica descrita en la sección II.2.4, previo a la metodología CPE-UABE-GC-ECD usando las siguientes condiciones: a) 1 mL Tritón X-114 100 g L<sup>-1</sup>, b) 0,1 mL NaCl 359 g L<sup>-1</sup>, c) Tiempo de extracción 30 min, d) Temperatura de extracción 70 °C y e) UABE: 250 µL de isoctano, 20 min.

Los resultados obtenidos con los diferentes solventes para UAE se muestran en la **Figura 19**. La mayor respuesta relativa de los PBDE se alcanzó con la mezcla de acetona y hexano 30:70 v/v respectivamente. El uso de estos solventes, en diferentes proporciones, se reportó previamente para la extracción de PBDE de muestras de tejidos biológicos [118,121]. Aún cuando los PBDE muestran gran afinidad por los solventes orgánicos con baja polaridad, como el hexano, su capacidad de penetración a través de los tejidos es menos eficiente que los solventes con polaridad alta [126]. Por otro lado, la acetona es un solvente polar y es capaz de desnaturalizar las estructuras proteicas de los MFGM presentes en la leche, permitiendo una accesibilidad más fácil a los solventes no polares. Así, la mezcla acetona:n-hexano lleva a la eficiencia de extracción más alta de los lípidos no polares asociados a los PBDE [6].

### 4.3.2 Técnica UAE

Una vez seleccionada la combinación apropiada de solventes para la lixiviación de los PBDE en las muestras de leche, se optimizó la etapa de extracción. Los efectos de las ondas ultrasónicas en la lixiviación incluye varios fenómenos físico-químicos como agitación, vibración, presión, ondas de choque, fuerzas de choque, chorros microscópicos, compresión y rarefacción, transmisión acústica, cavitación y formación de radicales [108].

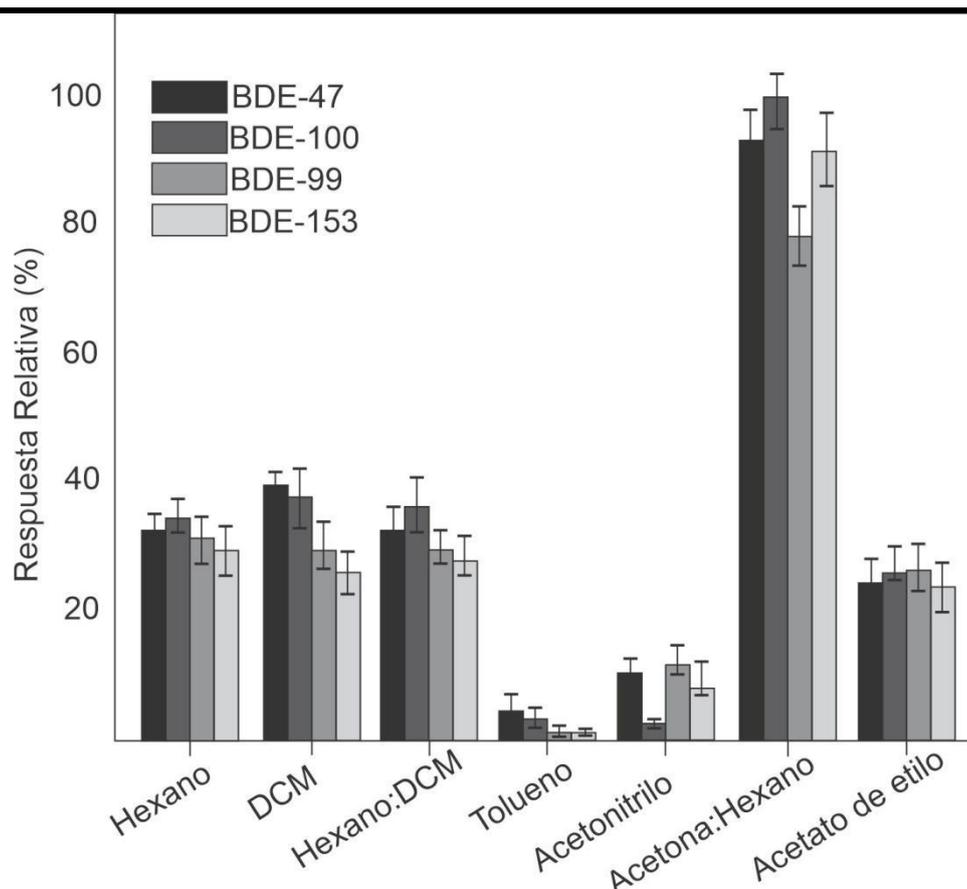


Figura 19. Efecto de los diferentes solventes para lixiviación sobre la respuesta relativa de los PBDE. La metodología analítica utilizada está descrita en la sección 5.2.4. Condiciones de CPE-UABE: 1 mL Tritón X-114 100 g L<sup>-1</sup>, 0,1 mL NaCl 359 g L<sup>-1</sup>, 30 min de tiempo de extracción a 70 °C; UABE: 250 µL isoctano, 20 min.

La principal fuerza impulsora para los efectos de extracción por medio de la sonicación a la frecuencia de ultrasonido de trabajo (40 kHz) es la cavitación acústica [106]. Cuando el ultrasonido se propaga a través de cualquier medio, induce una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del medio. Dichos cambios alternativos de presión causan la formación y, en última instancia, el colapso de burbujas en un medio líquido, y se conoce como "cavitación acústica" [106]. La cavitación de las burbujas también interrumpe la capa límite saturada que rodea las partículas, lo que permite que el solvente fresco alcance la superficie de

la partícula, favoreciendo la transferencia de masa de los analitos al medio, mejorando así la eficiencia de lixiviación de la técnica UAE [236]. Además del tiempo de sonicación, el programa de ciclos de ondas ultrasónicas combinado con pausas breves ayuda a mejorar la eficiencia de lixiviación [236].

El volumen de solvente, el tiempo de lixiviación, el número de extracciones sucesivas y el efecto de los descansos durante la etapa de lixiviación se seleccionaron para un diseño experimental factorial completo ( $2^k$ ) con el fin de identificar esas variables y su interacción, las cuales condicionan la técnica de lixiviación. El volumen de solvente de lixiviación (acetona:hexano, 30:70 v/v) se evaluó a 0,5 y 1 mL. El efecto de las extracciones sucesivas se evaluó considerando uno y dos pasos de lixiviación sucesivos.

Además, se analizaron los ciclos de etapas múltiples de la irradiación US, con 2 paradas y una interrupción de 1 minuto entre cada ciclo. Para hacer posible una comparación con un modo continuo, se estudió el tiempo total de irradiación US a 10 y 30 minutos. El efecto del pH se evaluó en ensayos de extracción previos y no mostró afectar la señal analítica de los PBDE diana. La metodología de preparación de muestras para este estudio se realizó como se describe en la sección 5.2.4.

Las condiciones de trabajo de CPE-UABE utilizadas durante la optimización de la técnica UAE fueron las siguientes: 1 mL Tritón X-114 100 g L<sup>-1</sup>, 0,1 mL NaCl 359 g L<sup>-1</sup>, 30 min de tiempo de extracción a 70 ° C; UABE: 250 µL de isoctano, 20 min. Los resultados se muestran en la **Tabla 20** y las gráficas de Pareto en la **Figura 20**. Las variables que mostraron significancia en la respuesta analítica ( $p < 0,1$ ) de los PBDE estudiados fueron el volumen de solvente de lixiviación y el uso de interrupciones a lo largo de la irradiación US y aquellas interacciones entre las variables (interacciones dobles y triples). En consecuencia, se establecieron dos extracciones sucesivas con dos pausas durante el tiempo de lixiviación para los siguientes ensayos. Para la optimización, se consideró el volumen del solvente de lixiviación (en el rango de 0,5-3,0 mL) y el tiempo de lixiviación (en el rango de 5-45 min) (**Tabla 21**), que consistió en un total de 14 ensayos en el análisis del CCD. La respuesta analítica resultante para BDE-47 y -100 se explicó mejor con modelos lineales, mientras que los modelos cúbicos explicaron mejor las respuestas analíticas de BDE-99 y -153.

*Tabla 20. Variables y niveles (valores) evaluados en el diseño experimental factorial de la técnica UAE.*

<b>Variable</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
<b>A</b> Volumen de solvente [mL]	0,5	3
<b>B</b> Número de extracciones	1	2
<b>C</b> Interrupciones	No	Si (2)

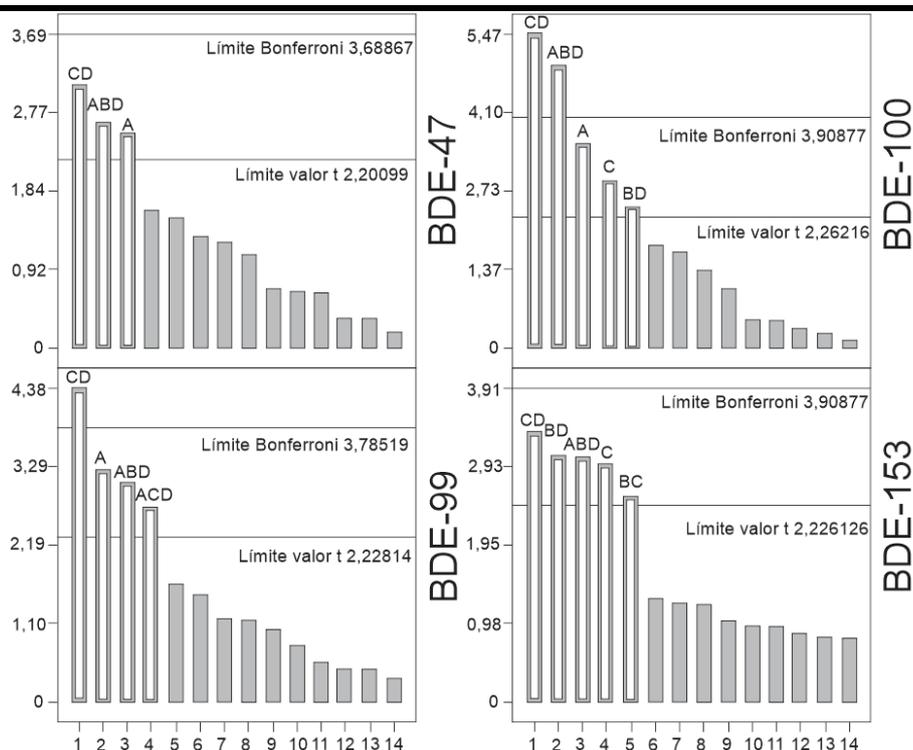


Figura 20. Gráficas de Pareto para la técnica UAE estudiada. Las variables y sus niveles (valores) están detallados en la tabla 25. Condiciones de trabajo para CPE-UABE: 1mL Tritón X-114 100 g L<sup>-1</sup>, 0,1 mL NaCl 359 g L<sup>-1</sup>, 30 min de tiempo de extracción a 70 °C; UABE: 250 μL isooctano, 20 min. Concentración de PBDE: 5 ng g<sup>-1</sup>.

La **Tabla 21** muestra los parámetros estadísticos correspondientes al ajuste para la resolución. Como se puede observar, los modelos fueron significativos ( $p < 0,05$ ) y sus faltas de ajuste no fueron significativas ( $p > 0,05$ ). Los valores de  $p$  mostraron, a un nivel de confianza del 95%, que el volumen del solvente de lixiviación y el efecto del tiempo de extracción condicionaron la eficiencia de extracción de los PBDE y, por lo tanto, su respuesta analítica. La combinación de estas variables garantiza una desnaturalización efectiva de la MFGM y una extracción eficiente de los lípidos no polares junto con los PBDE. En este sentido, el volumen del solvente de lixiviación jugó un papel importante humedeciendo la matriz y luego extrayendo los compuestos; y la variable de tiempo de extracción podría condicionar la cinética de este proceso. Con base en estos resultados, es posible decir que el proceso de lixiviación fue favorecido por la radiación US.

Tabla 21. Diseño central compuesto para la técnica UAE

#### Variables y niveles estudiados

Variable	Niveles <sup>a</sup>			
	Mínimo		Máximo	
A Volumen de solvente [mL]	0,50		3,00	
B Tiempo de lixiviación [min]	5		45	
<b>Valores estadísticos obtenidos para los modelos seleccionados</b>				
	<b>BDE-47</b>	<b>BDE-100</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>
<b>Modelo</b>	Lineal	Lineal	Cúbico	Cúbico
	<b>valor <math>p^{46}</math></b>			
<b>Modelo</b>	0,0190	0,0046	0,0309	0,0097
<b>Falta de ajuste</b>	0,7229	0,7384	0,8651	0,8042
<b>I</b>	<b>0,0190</b>	<b>0,0046</b>	<b>0,0044</b>	<b>0,0016</b>
<b>II</b>	0,7725	0,6283	0,8103	0,6723
<b>I-II</b>	<sup>47</sup>	-	0,8470	<b>0,0039</b>
<b>I<sup>2</sup></b>	-	-	0,1809	0,2813
<b>II<sup>2</sup></b>	-	-	0,0937	<b>0,0102</b>
<b>I*II<sup>2</sup></b>	-	-	<b>0,0136</b>	-
<b>I<sup>2</sup>*II</b>	-	-	-	<b>0,0192</b>

Bajo los criterios de optimización mencionados, las condiciones experimentales correspondientes a uno de los máximos en la función  $D$  ( $D=0,879$  en la **Figura 21**) fueron tiempo de lixiviación: 25 min; pasos de lixiviación: 3 (dos paradas, 1 minuto de pausa entre cada ciclo); solvente de lixiviación volumen total: 3 mL; Pasos sucesivos de lixiviación: 2. Los valores sugeridos a través del procedimiento de optimización se corroboraron experimentalmente.

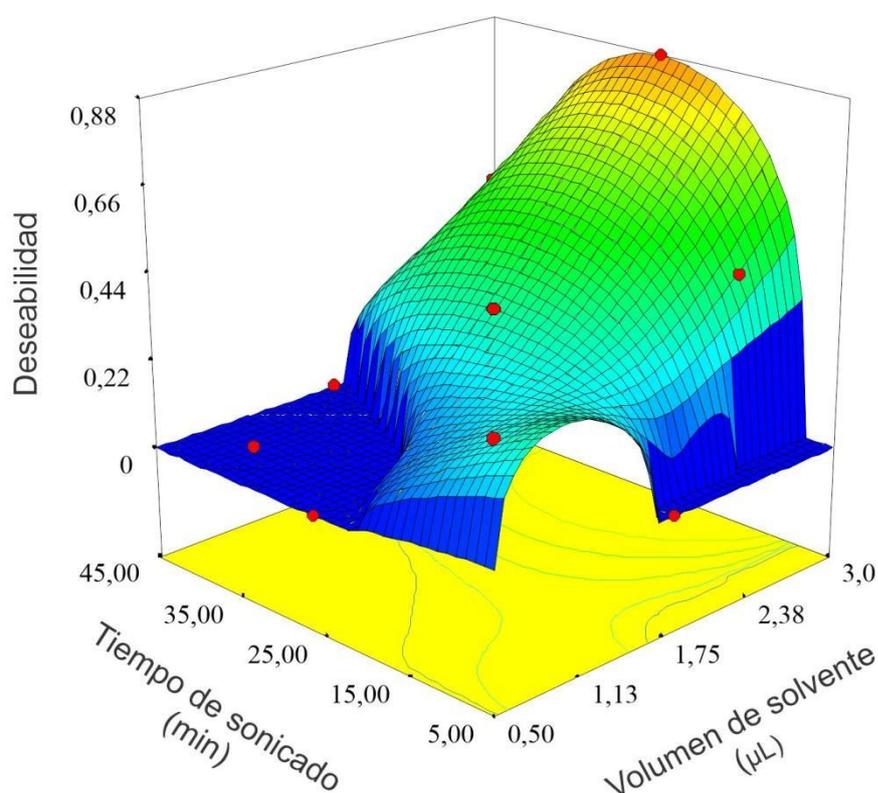
#### 4.3.3 Técnicas CPE-UABE

Las micelas están en un equilibrio dinámico con sus monómeros donde cada monómero puede abandonar la micela y pueden ser reemplazados por otros. El tiempo del monómero dentro de una micela depende del tipo y la estructura de la molécula, mientras que el tiempo de salida del monómero y su retorno depende de su velocidad de difusión. Las micelas se pueden alterar mediante la selección adecuada de los parámetros de la solución, como la temperatura, la concentración del tensioactivo, así como la presencia, el tipo y la concentración de modificadores en la solución [102]. Por lo tanto, se debe considerar estas variables en el estudio y la optimización de la técnica de CPE para lograr la máxima eficiencia. El uso de la CPE como metodología de preparación de muestras antes del análisis por GC está limitado por el riesgo de

<sup>46</sup> Considerando significativo cuando  $p < 0,05$ .

<sup>47</sup> no incluido en el modelo

bloqueo de la columna debido a la viscosidad y la no volatilidad de la fase rica en tensioactivo resultante. Por lo tanto, después de la CPE y antes de la inyección en GC, se requiere una etapa suplementaria como UABE [6]. La optimización de CPE y UABE se realizan juntas, ya que, la fase de extracción obtenida en la etapa de CPE se utiliza como fase donante en la etapa de la UABE. La metodología de preparación muestras para este estudio se realizó como se describe en la sección 5.2.4. Se evaluó el uso de ultrasonido y temperatura, y una combinación de estas variables. Como puede verse en la **Figura 22** la combinación de ultrasonido con temperatura fue necesaria para lograr la mayor respuesta analítica de los PBDE. Después de seleccionar las condiciones de retro-extracción apropiadas, la técnica CPE se optimizó junto con el procedimiento UABE establecido.



*Figura 21. Respuesta analítica usando el CCD obtenido del trazado de: tiempo de sonication (min) vs volumen de solvente de lixiviación (mL) para la etapa de UAE.*

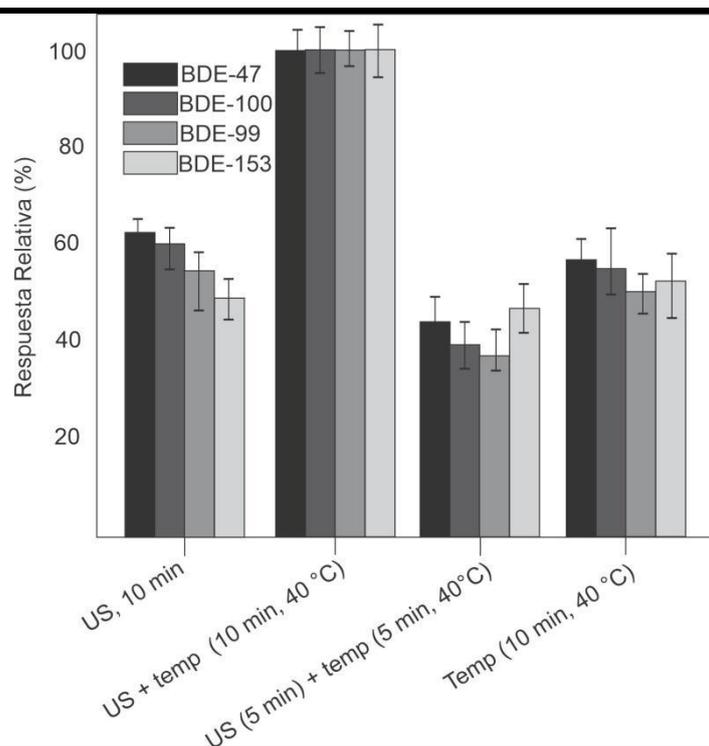


Figura 22. Efecto del tratamiento de la técnica de retro-extracción sobre la respuesta relativa de los PBDE. La metodología analítica está descrita en la sección 5.2.4.

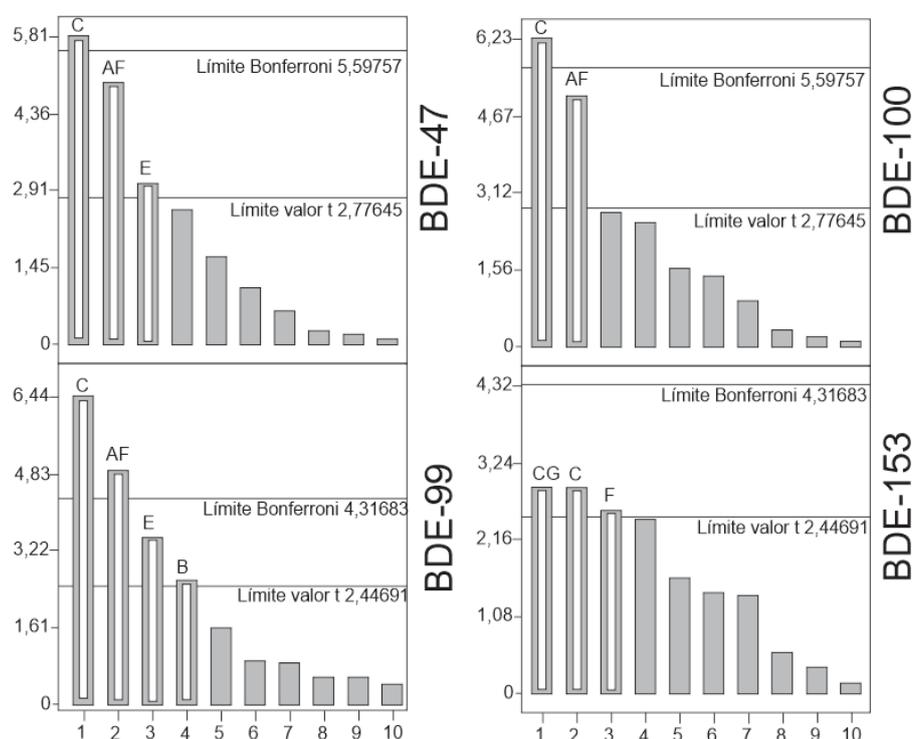
Se seleccionaron aquellas variables que podrían influir en la extracción y la retro-extracción de los analitos para un monitoreo inicial utilizando un diseño factorial fraccional ( $2^{k-1}$ ). La selección se llevó a cabo considerando las siguientes condiciones: efecto salino utilizando dos tipos diferentes de sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y  $\text{NaCl}$ ); concentración de tensioactivo (0,1 y 0,5 mL Tritón X-114  $100 \text{ g L}^{-1}$ ); temperatura de trabajo y tiempo necesario para la extracción (55 y  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , y 5 y 30 min, respectivamente), así como el volumen de solvente de retro-extracción (0,15 y 0,25 mL de isooctano) y el tiempo de retro-extracción (3 y 10 min). Las condiciones de trabajo se sintetizaron en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Variables and levels (values) evaluated in factorial experimental design of CPE-UABE.

Variable	Valor mínimo	Valor máximo
<b>A</b> Tipo de sal	$\text{NaCl}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$
<b>B</b> Concentración de sal [% p/v]	No (0)	Si (0,6)
<b>C</b> Concentración de Tritón-X114 [% p/v]	0,5	1,0
<b>D</b> Temperatura de extracción [ $^\circ\text{C}$ ]	55	70
<b>E</b> Tiempo de extracción [min]	5	30
<b>F</b> Volumen de isooctano para retro-extracción [mL]	0,15	0,25
<b>G</b> Tiempo de retro-extracción [min]	3	10

Los gráficos de Pareto (**Fig. 23**) muestran las variables individuales con significancia en la respuesta analítica ( $p < 0,1$ ) de los PBDE. Las variables fueron la concentración de Tritón X-114,

adición y tipo de sal, tiempo de extracción y volumen de isoctano para la retro-extracción, e interacciones entre las variables. La temperatura durante la extracción no demostró ser significativa a los niveles de temperatura evaluados, y en consecuencia se seleccionaron 55 °C para experimentos adicionales. La optimización utilizando CCD se llevó a cabo considerando las concentraciones de sal (NaCl) y Tritón X-114 dentro del rango de 0 a 5% (p/v) y 0,3 a 1% (p/v) respectivamente, tiempo de extracción en el rango de 5-60 min y el volumen de isoctano en el rango de 0,05 a 3,00 mL. El método consistió en un total de 22 ensayos. La respuesta analítica resultante de los PBDE bajo el efecto de las variables estudiadas se informa en la **Tabla 23**. Los resultados se explicaron mejor mediante modelos cuadráticos para los PBDE analizados. La **tabla 23** también muestra los parámetros estadísticos correspondientes al ajuste para la resolución.



*Figura 23. Gráficas de Pareto para las técnicas CPE-UABE estudiada. Las variables y sus niveles (valores) están detallados en la Tabla 23. Condiciones de trabajo para UAE: tiempo de lixiviación: 25 min, etapas de lixiviación: 3 (dos interrupciones, con 1 minuto de descanso entre cada ciclo), volumen total de solvente de lixiviación: 3 mL etapas sucesivas de lixiviación: 2. Concentración de PBDE: 5 ng g<sup>-1</sup>.*

Como se puede observar, los modelos fueron significativos ( $p < 0,05$ ) y sus faltas de ajuste no fueron significativos ( $p > 0,05$ ). Los valores de  $p$  del estudio multivariado mostraron que, a un nivel de confianza del 95%, la concentración de NaCl y Tritón X-114 y el tiempo de extracción afectan la eficiencia de extracción de los PBDE y, por lo tanto, su respuesta analítica. La

concentración de tensioactivo debe estar por encima de la concentración micelar crítica para formar una fase micelar efectiva para extraer eficientemente los analitos [102].

El efecto salino se basa en desfavorecer la solvatación de los analitos no polares en el medio acuoso, mejorando así su afinidad por el medio no polar como las micelas, favoreciendo la eficiencia de extracción de la técnica [108]. El tiempo de extracción es una variable relacionada con la cinética de la transferencia de masas de los analitos de la solución acuosa a las micelas [108]. Por lo tanto, se esperó que todas estas variables fueran significativas para el paso de extracción. Las condiciones experimentales correspondientes a uno de los máximos en la función  $D$  ( $D=0,972$  y  $D=0,961$  **Figura 24.A y B**, respectivamente) fueron: 1% p/v Tritón X-114, 4% p/v NaCl y 55 °C durante 10 min como temperatura y tiempo de extracción, respectivamente. Dado que el volumen de isoctano no mostró una influencia significativa en la respuesta analítica de los analitos, se fijó en 90  $\mu$ L. Los valores sugeridos a través del procedimiento de optimización fueron corroborados experimentalmente.

Tabla 23. Diseño Central Compuesto para CPE-UABE

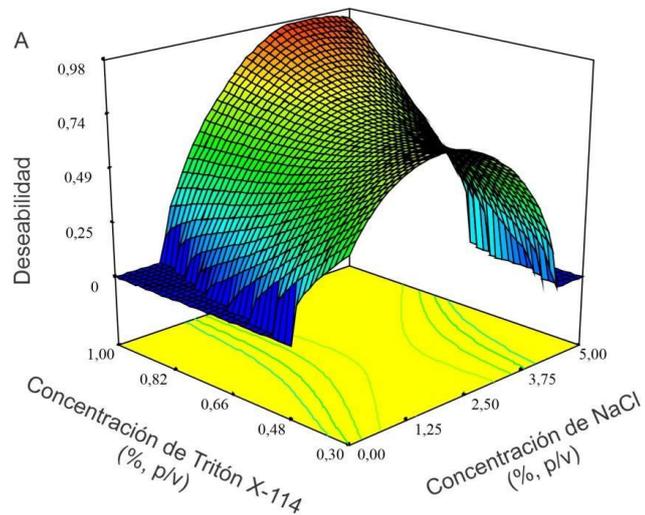
<b>Variables y niveles ensayados</b>				
<b>Variable</b>	<b>Niveles</b>			
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>		
<b>A</b> Concentración de NaCl [% p/v]	0,0	5,0		
<b>B</b> Concentración de Tritón-X114 [% p/v]	0,3	1,0		
<b>C</b> Tiempo de extracción [min]	5,0	60		
<b>D</b> Volumen de isoctano [mL]	0,05	3,00		
<b>Valores estadísticos obtenidos para los modelos seleccionados</b>				
<b>Modelo</b>	<b>BDE-47</b>	<b>BDE-100</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>
	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático
		o	o	o
<b>valor <math>p^{48}</math></b>				
<b>Modelo</b>	0,0063	0,0068	0,0047	0,0076
<b>Falta de ajuste</b>	0,9906	0,9791	0,9811	0,8506
<b>I</b>	0,1055	0,3176	0,1412	0,3830
<b>II</b>	0,7905	0,8874	0,6080	0,3780
<b>III</b>	<sup>49</sup>	0,0268	-	-
<b>I-II</b>	<b>0,0091</b>	0,1034	<b>0,0162</b>	<b>0,0362</b>
<b>I-III</b>	-	<b>0,0364</b>	-	-

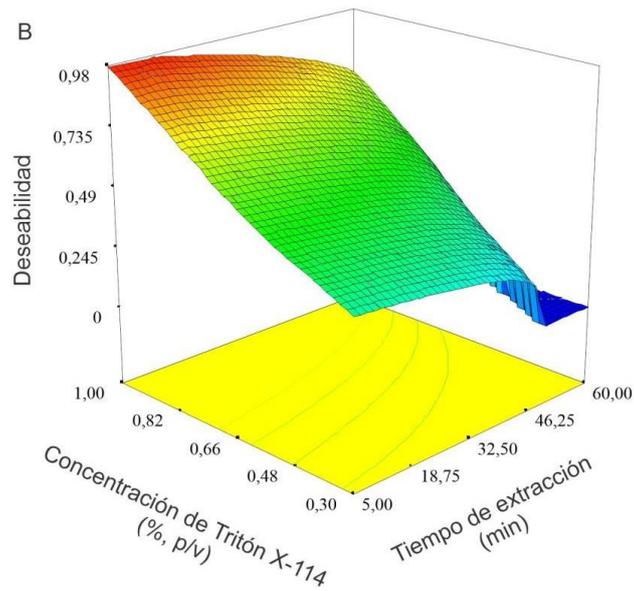
<sup>48</sup> Considerando significativo cuando  $p < 0,05$ .

<sup>49</sup> no incluido en el modelo

II-III	-	-	-	-
I <sup>2</sup>	0,0066	0,0020	0,0022	0,0048
II <sup>2</sup>	-	-	-	0,0289

Las variables optimizadas de UABE difieren de las de UAE, lo cual son resultados esperados. En la técnica UAE, la lixiviación se llevó a cabo a partir de una muestra de leche, mientras que la retro-extracción se realizó a partir de una fase rica en tensioactivo resultante después de la CPE. La temperatura condiciona las tasas de difusión de los analitos y solventes, así como los fenómenos de cavitación [106,236]. Estos fenómenos compiten entre ellos, por lo tanto, a temperatura ambiente podría favorecer la lixiviación de los analitos desde los MFGM de la leche mediante el aumento de los fenómenos de cavitación. Mientras que la temperatura alta (55 °C) disminuye la viscosidad de las fases, tensioactivo y solvente, y aumenta la velocidad de difusión de los analitos.





---

Figura 24. Respuesta analítica usando el CCD obtenido del trazado de: A. concentración de Tritón X-114 (% p/v) vs concentración de ClNa (% p/v) y B. concentración de Tritón X-114 (% p/v) vs tiempo de extracción (min) para la etapa de CPE-UABE.

4.4 Re  
ndi  
mie  
nto  
ana  
lític  
o y  
apli  
cac  
ión  
a  
mu  
estr  
as  
real  
es

Las figuras de mérito analítico de la metodología analítica propuesta y los estudios de recuperación se resumen en la **Tabla 24**. La cuantificación de los PBDE por GC-EDC se realizó utilizando curvas de calibración externas [162] de matriz pareada, para evitar los efectos de la matriz, dentro de los rangos de concentración de 0,5-500 ng g<sup>-1</sup>, 0,18-500 ng g<sup>-1</sup>, 0,20-500 ng g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> y 0,70-500 ng g<sup>-1</sup> para BDE-47, -100, -99 y -153, respectivamente. Las curvas de calibración se construyeron utilizando 5 puntos en el rango mencionado, considerando los niveles reportados de PBDE en este tipo de muestras. Cada secuencia analítica incluyó blancos de procedimiento. Las curvas de calibración se aplicaron utilizando un ajuste lineal que logró coeficientes de correlación ( $r$ ) > 0,940. La precisión de la metodología se evaluó mediante RSD intra-día de 5 muestras enriquecidas con 5 ng g<sup>-1</sup> p.s., lo que llevó a valores de RSD <5%.

La metodología optimizada se aplicó para analizar muestras de leche (humana y comercial). Tanto las muestras comerciales como las muestras humanas no informaron niveles de PBDE por encima de sus LOD. Con el fin de validar la metodología analítica, se realizó un estudio de recuperación de PBDE a dos concentraciones diferentes (1 ng g<sup>-1</sup> y 25 ng g<sup>-1</sup>). La **Figura 25** muestra dos cromatogramas correspondientes a una muestra de leche (humana) con adición de 1 ng g<sup>-1</sup> de PBDE y sin adición. La prueba  $t$  ( $n=2$ ,  $\alpha=0,95$ ) ejecutada para los datos no mostró diferencias significativas con los niveles de concentración de PBDE adicionados. Aunque la cantidad de informes sobre los niveles de PBDE en muestras biológicas y ambientales de Argentina es escasa para llegar a una conclusión general [134,237–239] es útil como indicativo de baja exposición a estos contaminantes a través de la dieta o el medio ambiente, lo cual es consistente con los resultados obtenidos de las muestras analizadas.

Aunque la metodología de preparación de la muestra se propuso para el análisis de PBDE mediante análisis de GC, podría ser factible acoplarla a las técnicas de cromatografía líquida o de electroforesis capilar, con un ajuste mínimo. Por lo tanto, esta metodología de preparación de muestras se podría usar para analizar PBDE y/u otros compuestos, en muestras de leche humana por cromatografía líquida y electroforesis capilar. Vale la pena considerar que la técnica instrumental principalmente informada para el análisis de PBDE es el GC, debido a su resolución analítica y a la sensibilidad alcanzable. Estos analitos, pueden analizarse por cromatografía líquida, sin embargo, su resolución es más baja que por GC [92].

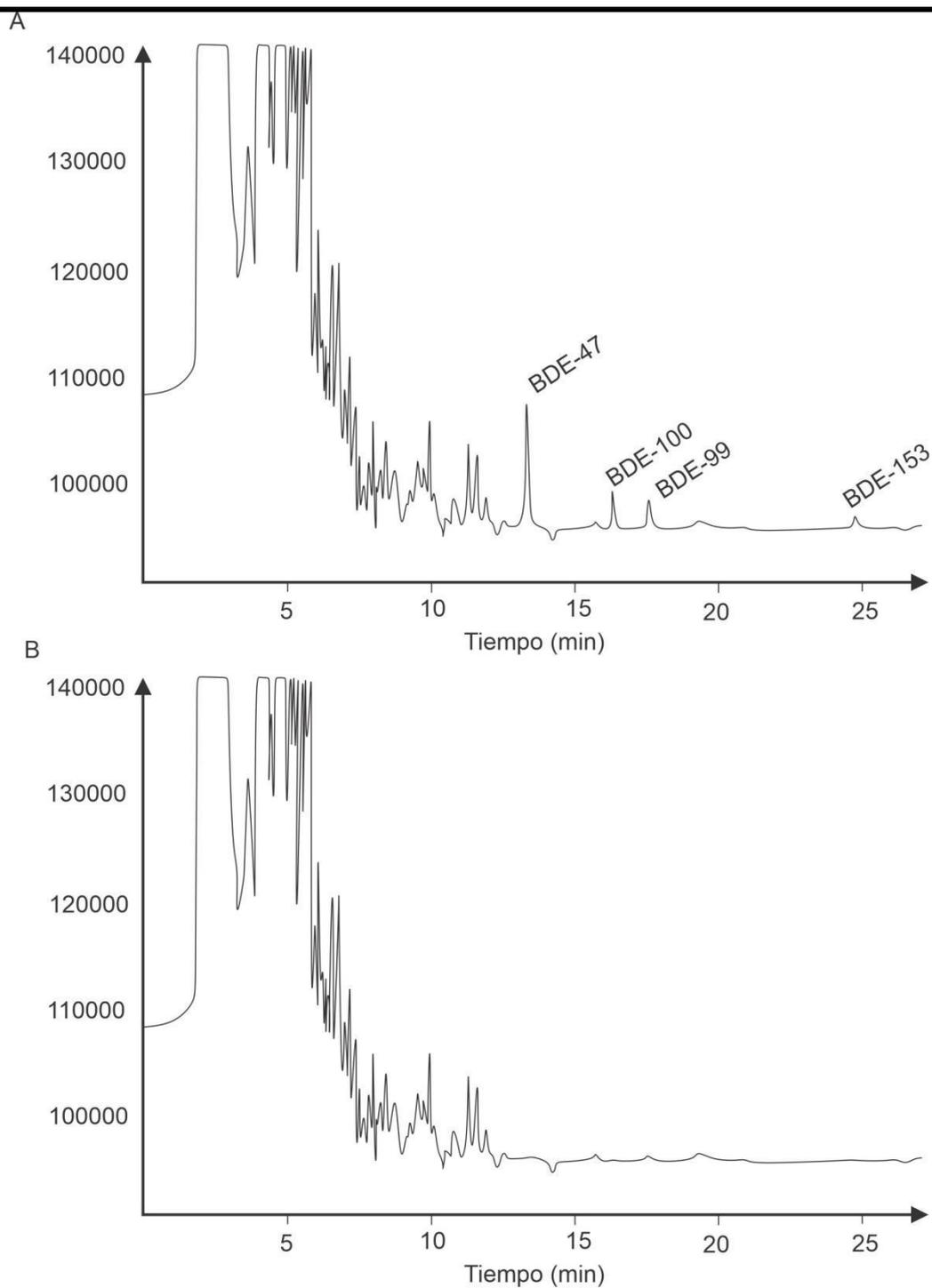


Figura 25. Cromatograma de GC-ECD obtenido del análisis de una muestra de leche humana A) con adición de  $1 \text{ ng g}^{-1}$  de PBDE, B) sin agregado de estándar. Las condiciones metodológicas están descritas en la sección 5.2.4.

Tabla 24. Figuras de mérito analítico, estudio de la recuperación y aplicación a muestras reales de la metodología UAE-CPE-UABE-GC-ECD para determinar PBDE en muestras de leche humana.

		<b>BDE-47</b>	<b>BDE-100</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>
Consumo de muestra [g]	0,5				
Volumen de solvente [mL]	3,1				
Recuperación [%]		70	70	68	69
RSD [%]		4,1	4,6	4,4	4,9
LOD [ng g <sup>-1</sup> p.s.]		0,05	0,13	0,15	0,50
Rango lineal <sup>50</sup> [ng g <sup>-1</sup> p.s.]		0,08 – 500	0,18 – 500	0,20 – 500	0,70 – 500
<b>Leche</b>	<b>Agregado [ng g<sup>-1</sup>]</b>	<b>BDE-47</b>	<b>BDE-100</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>
<b>Encontrado [ng g<sup>-1</sup>]<sup>51</sup></b>					
<b>Muestra (leche humana)</b>	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	1	0,92±0,05	0,89±0,04	0,84±0,07	0,80±0,09
	25	24,8±1,22	23,3±1,21	22,5±0,97	21,2±1,53
<b>Muestra (leche comercial 1)</b>	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	1	0,90±0,08	0,96±0,05	0,75±0,08	0,82±0,10
	25	23,0±1,08	24,5±1,37	22,3±1,16	21,8±1,70
<b>Muestra (leche comercial 2)</b>	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	1	0,95±0,07	0,90±0,04	0,88±0,07	0,79±0,09
	25	23,5±1,22	22,3±1,36	23,0±1,57	20,8±1,33

<sup>50</sup> 95% intervalo de confianza; n=5

<sup>51</sup> Resultados expresados como  $\bar{x} \pm t \text{SD}/\sqrt{n}$ ; n=3; 95% intervalo de confianza

**4.5 Co**

**mp**

**ara**

**ció**

**n**

**de**

**UA**

**E-**

**CP**

**E-**

**UA**

**BE-**

**GC-**

**EC**

**D**

**con**

**otr**

**as**

**met**

**141**

**odo**

**logí**

**as**

**ana**

**lític**

**as**

**par**

**a**

**det**

**erm**

**inar**

**PB**

**DE**

**en**

**mu**

**estr**

**as**

**de**

**lec**

**142**

he

hu

ma

na

Se realizó un análisis comparativo del desempeño de la metodología propuesta, UAE-CPE-UABE-GC-ECD, tomando en cuenta los datos bibliográficos que remarcan las cifras de mérito analítico de cada metodología. La **Tabla 25** resume las metodologías analíticas reportadas en la literatura para determinar los PBDE en muestras de leche utilizando GC. Las metodologías informadas involucran diferentes técnicas analíticas, y su combinación, para los enfoques de preparación de muestras. Dos de los cinco informes implican una técnica analítica verde dentro de la metodología de preparación de la muestra [6,32]. Las cifras analíticas de los méritos de la metodología UAE-CPE-UABE-GC-ECD (rango lineal, RSD% y consumo de muestra) fueron del mismo orden de magnitud de las informadas anteriormente. Resultó más sencillo y es adecuado para la preparación de muestras biológicas por lotes utilizando equipos simples disponibles en la mayoría de los laboratorios. UAE-CPE-UABE requiere un pequeño volumen de solventes orgánicos (aproximadamente 3 mL) a diferencia de las técnicas tradicionales LLE o SPE, lo que la convierte en una metodología de bajo costo y respetuosa con el medio ambiente. La metodología propuesta se pudo aplicar con éxito para determinar cuatro PBDE (-47, -99, -100 y -153) con un análisis cromatográfico de 25 min.

Tabla 25. Comparación de UAE-CPE-UABE-GC-ECD con otras metodologías analíticas para determinar PBDE en muestras de leche humana

Técnica instrumental	Muestra [g]	Pre-tratamiento	Volumen de solvente [mL]	Técnica de extracción	Técnica de limpieza del extracto	PBDE estudiados	Ref
GC-MS/MS	5	5 mL isopropanol + 7 g hidromatrix	120	PLE-ASE PLE: 100 °C, 1500 psi, 5 min 3 veces.	LLE: 2X2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 10 mL C <sub>6</sub> . SPE: 1,2 g NaSO <sub>4</sub> anhidro + 3,2 g sílica ácida (44% p/p) Elusión: 10 mL C <sub>6</sub> :DCM 1:1 v/v	-10, -7, -15, -28, -49, -47, -100, -99, -85, -154, -153, -138, -183	[119]
GC-MS	5	5 mL NaOH 50 % (p/v) + 1 mL EtOH, 1 h, 70 °C	23	LLE: 5x4 mL éter de petróleo. 2 mL ACN + agit. DLLME: 1 mL sobrenadante + 22 µL tetracloroetano en 5 mL H <sub>2</sub> O desionizada	-	-47, -100, -99, -85, -154, -153	[167]
GC-MS	5	5 mL NaOH 50 % (p/v) + 1 mL acetone, 70 °C	7	LLE: 5 mL hexano	Columna Florisil® 2x2 mL hexano + N <sub>2</sub> + 2 mL acetona. DLLME: 1 mL acetona + 5 mL H <sub>2</sub> O + 19 µL clorobenceno	-47, -85, -99, -100, -153, -154	[240]
GC-ECD	0,5	UAE: 2x1,75 mL acetona:hexano 1:1 v/v	3,5	CPE: 0,5 mL de Tritón X-114 1% (p/v), 10 min 55 °C	UABE: 90 µL isoctano, 3 min, 40 °C	-47, -100, -99, -153	actual

## 4.6 Conclusiones parciales

La metodología analítica propuesta basada en la combinación de las técnicas analíticas verdes (UAE, CPE y UABE) demostró ser un enfoque eficaz para la preparación de muestras biológicas antes del análisis por GC para la determinación de PBDE en niveles traza. Esta metodología expande las fronteras de aplicación de CPE para el análisis de muestras biológicas por GC. Aunque la metodología de preparación de la muestra se propuso para el análisis de PBDE mediante análisis por GC, podría ser factible acoplarla con otras técnicas de separación en fase líquida, como la cromatografía líquida o las técnicas de electroforesis capilar, con un ajuste mínimo. La herramienta estadística de diseño experimental ayudó a identificar y caracterizar aquellas variables que tuvieron más influencia en el sistema y también sus interacciones. La metodología de preparación de muestras resultante, UAE-CPE-UABE, es simple y es adecuada para la preparación de lotes utilizando equipos disponibles en la mayoría de los laboratorios. Bajo condiciones de trabajo optimizadas, los LOD se encontraron en el orden de nanogramos por gramo, adecuados para aplicaciones del mundo real. Aunque no se detectaron PBDE en las muestras analizadas, este trabajo representa una contribución debido a la falta de información sobre los niveles de PBDE en muestras humanas de Argentina.

### 1.4.1.1.1



**1.4.1.1.1.2 ANEXO 2: *Material suplementario del capítulo IV.***

**5.1 Oc**

**urr**

**enc**

**ia**

**de**

**PF**

**R y**

**sus**

**met**

**abo**

**lito**

**s**

**en**

**agu**

**as**

**resi**

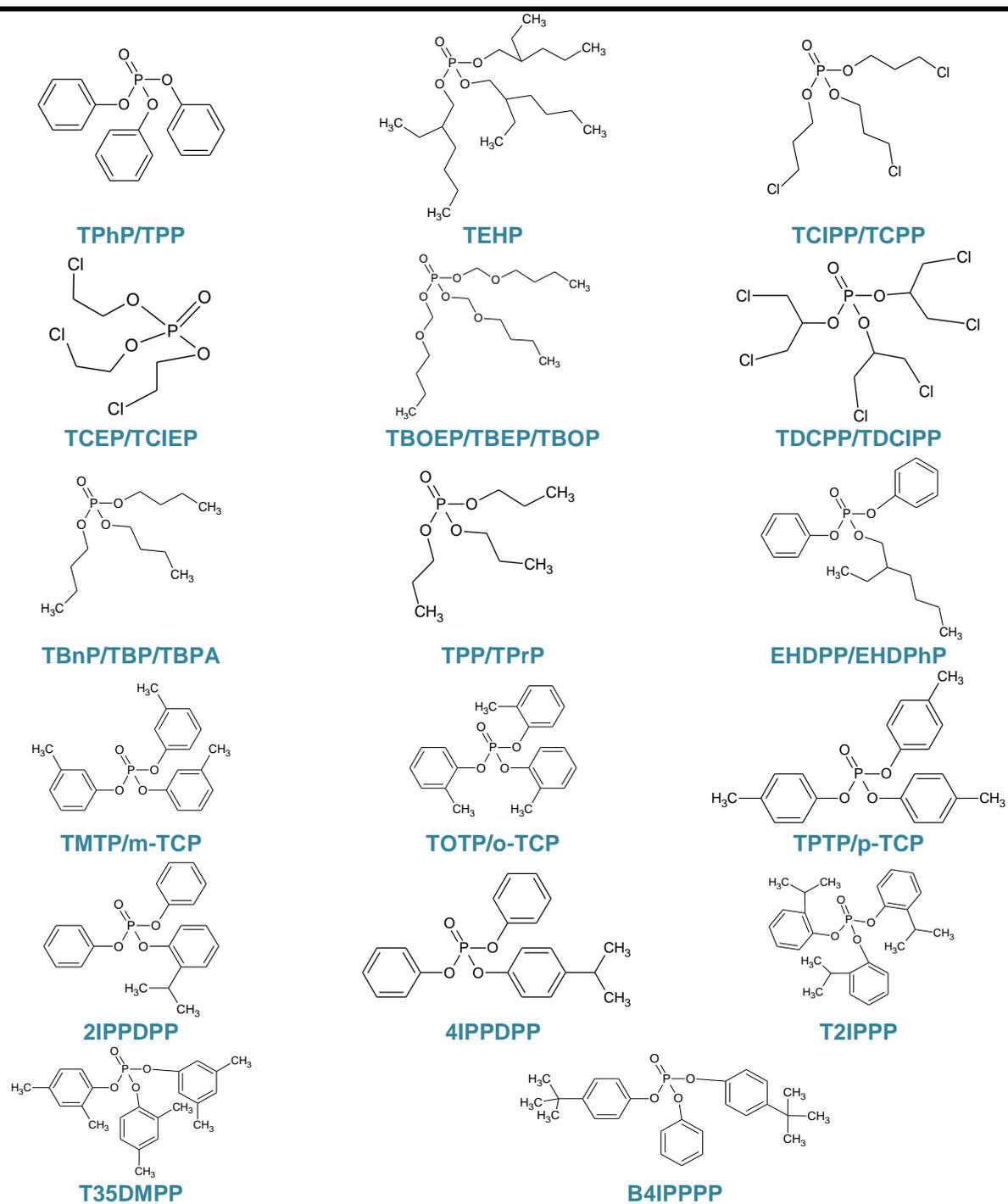
**dua**

**les**

**de**

**148**

5.1.1 **Figura A.1.: Estructuras químicas de los PFR nombrados en el capítulo VI.**



**5.1.2 Tabla A.1.: Biosólidos obtenidos de la centrifugación de las muestras de aguas residuales y cantidad de cobre en polvo agregado por cada muestra para la etapa de preparación de muestras**

Planta	Día	Volumen de muestra [L]	Peso del biosólido seco [g]	Peso de cobre en polvo agregado [g]
<b>A</b>	1	4,5	0,446	0,892
	2	4,5	0,394	0,789
	3	4,5	0,438	0,877
	4	4,5	0,411	0,822
	5	4,5	0,380	0,760
	6	4,5	0,414	0,828
	7	4,5	0,357	0,714
<b>B</b>	1	4,5	0,575	1,149
	2	4,5	0,584	1,168
	3	4,5	0,640	1,279
	4	4,5	0,817	1,633
	5	4,5	0,661	1,322
	6	4,5	0,723	1,446
	7	4,5	0,571	1,141

**5.1.3 Análisis instrumental de las metodologías analíticas utilizadas en el capítulo III para determinar PFR y sus metabolitos y sus LOD y LOQ**

*Determinación de PFR en la fracción de biosólidos*

El desarrollo y validación de esta metodología fue desarrollada por Neel Van den Eede y colaboradores (2012) [241] para muestras de polvo.

Reactivos y soluciones

Los solventes utilizados durante el análisis fueron todos de grado analítico. El n-hexano se adquirió de Acros Organics (Geel, Bélgica). Se adquirieron acetona, diclorometano, acetato de etilo, isooctano y metanol de Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares de TEP, TPrP, TiBP (tri-isobutil fosfato), TnBP, TPhP, TCEP, TCPP (mezcla de 4 isómeros) y TDCPP (mezcla de 2 isómeros) se compraron de Chiron AS (Trondheim, Noruega). El fosfato de triamilo (TAP; IS<sub>1</sub>) se adquirió de TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica). TPhP-D<sub>15</sub> (IS<sub>1</sub>) y TBEP se compraron de Sigma Aldrich. El TCPP (mezcla de 3 isómeros) se adquirió de Pfaltz & Bauer (Waterbury, CT, EE. UU.). La pureza de los estándares analíticos fue >98%, excepto TBEP (>94%). Las soluciones

estándar se prepararon en isooctano. Se compraron tubos vacíos de polipropileno (3 mL), cartuchos de SPE de 500 mg/3 mL Supelclean<sup>TM</sup> ENVITM-Florisil<sup>®</sup> de Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). El gel de sílice, el sulfato de sodio anhidro y el ácido sulfúrico concentrado (98%) se compraron en Merck. La preparación de sílice impregnada de ácido (44%, p/p) se llevó a cabo como se describe en el capítulo II sección 2.2.4. Los tubos de ensayo de vidrio se enjuagaron con n-hexano antes de su uso.

#### Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

La determinación de PFR se realizó en un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890B equipado con automuestreador de entrada multimodo Agilent 7693A acoplado a espectrómetro de masas triple cuadrupolo 7000C (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.), operado en modo de ionización por impacto electrónico. La separación se llevó a cabo con un capilar Zebron (5% fenil-arileno-95% dimetil siloxano) de 30 m x 0,18 mm ID y 0,18 µm de espesor (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) La temperatura de inyección se ajustó a 90 °C, en una columna HT-8 (25 m x 0,22 mm x 0,25 µm) trabajando a un flujo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> de helio (5.0, 99,999%, Air Liquid, Liège, Bélgica). El programa de temperatura del GC fue de 90 °C, durante 1,25 min, rampa de 10 °C min<sup>-1</sup> hasta 220 °C, luego rampa de 5 °C min<sup>-1</sup> hasta 300 °C, rampa de 40 °C min<sup>-1</sup> hasta 325 °C. La inyección fue de 1 µL de extracto de la muestra en modo sin división a 110 °C. El pulso de presión fue programado a 50 psi, con un flujo de purga dividido de 50 mL min<sup>-1</sup> y tiempo de purga de 1 min. Los LOQ y LOD de la metodología y los parámetros instrumentales se encuentran detallados en la siguiente tabla:

**Tabla A.2. Parámetros instrumentales usados para el análisis de los PFR.**

Compuesto	Tr <sup>52</sup>	IS <sub>1</sub>	MRM Q <sup>53</sup>	MRM q <sup>54</sup>	LOD [ng g <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng g <sup>-1</sup> ]
TnBP	9,50	TAP	211,1□99	155□99	0,6	2
TEHP	17,7	TAP	211,2□99	223,55□99	0,6	2
TCEP	10,7	TCEP-D <sub>12</sub>	248,8□63	204,9□63	0,6	2
TCIPP	11,1	TCEP-D <sub>12</sub>	277□125	201,1□99	0,6	2
TDCIPP	16,2	TDCIPP-D <sub>15</sub>	209,1□99	380,8□158,9	0,6	2
TPhP	17,0	TPhP-D <sub>15</sub>	325,7□169,1	214,8□169,1	0,6	2
EHDPP	17,3	TPhP-D <sub>15</sub>	250,8□77	250,8□153	0,6	2
TOTP	19,18	TPhP-D <sub>15</sub>	368□181,2	368□165,1	0,6	2
TMTDP	20,05	TPhP-D <sub>15</sub>	368□197,1	368□165,1	0,6	2
TPTDP	21,19	TPhP-D <sub>15</sub>	368□197,1	368□165,1	0,6	2
T2IPPP	21,18	TPhP-D <sub>15</sub>	452,3□251	452□335,2	0,6	2
T35DMPP	22,54	TPhP-D <sub>15</sub>	410□193,1	410□104	0,6	2
2IPDP	-	TPhP-D <sub>15</sub>	-	-	0,6	2

<sup>52</sup> Tr= tiempo de retención

<sup>53</sup> MRM Q= (del inglés *multiple reaction monitoring Q*)

<sup>54</sup> MRM q= (del inglés *multiple reaction monitoring q*)

4IPPDPP	-	TPhP-D <sub>15</sub>	-	-	0,6	2
B4IPPPP	-	TPhP-D <sub>15</sub>	-	-	0,6	2

#### *Determinación de metabolitos de PFR en la fracción de sobrenadantes*

El desarrollo y validación de esta metodología fue desarrollada por Frederic Been y colaboradores (2017 y 2018) [87,218].

#### Reactivos y soluciones

Los metabolitos HO-TBOEP, EHDPHP, HO-TPHP, HO-DPHP, BBOEHEP, BCIPP, BCIPHIPP, EHPHP, HO-EHDPHP, BCEP, TCEP-D<sub>12</sub>, BBOEHEP-D<sub>4</sub>, BDCIPP-D<sub>10</sub> y TBOEP-D<sub>6</sub> fueron sintetizados por el Dr. Vladimir Belov (Instituto Max Planck, Gotinga, Alemania). La pureza fue superior al 98% medida por técnicas de MS y resonancia magnética nuclear. TCEP y TPHP se compraron en Chiron AS (Trondheim, Noruega). TBOEP, DPHP y DPHP-D<sub>10</sub> se compraron en Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica). El estándar TCIPP se adquirió de Pfalz & Bauer (Waterbury, EE. UU.). El metanol utilizado fue de grado LC y se adquirió en Merck (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Alemania), mientras que el ácido clorhídrico (37%), el ácido fórmico (99-100%) y el acetato de amonio fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema PURELAB Flex ( $\rho=18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , Elga Veolia, Tienen, Bélgica). La SPE se realizó utilizando un colector de vacío Visiprep SPE con 24 puertos (Sigma-Aldrich). La filtración de muestras de aguas residuales se llevó a cabo utilizando filtros de microfibras de vidrio (GF/A, 1,6  $\mu\text{m}$ , Whatman, Sigma-Aldrich).

#### Cromatografía líquida-espectrometría de masas

El análisis de metabolitos de PFR se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida Agilent 1290 Infinity acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6460 Triple Cuadrupolo (LC-MS/MS, Santa Clara, CA, EE. UU.) Con una fuente de ionización por electroaspersión. La separación de los metabolitos se realizó en una columna Phenomenex Kinetex Bifenilo de fase reversa (2,1  $\times$  100 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ; Torrance, CA, EE. UU.), a una temperatura de columna de 40 °C. La fase móvil consistió en (A) agua ultrapura con metanol al 2% y acetato de amonio 5 mM y (B) metanol con agua ultrapura al 2% y acetato de amonio 5 mM. El gradiente de la fase móvil fue el siguiente: el gradiente inicial 5% de (B) que aumentó al 50% a los 3,5 min, luego aumentó al 65% a los 7,5 min, y alcanzó el 97% a los 9,5 min, y se mantuvo durante 4 y 3,5 min para equilibrar al 5%. El volumen de inyección se ajustó a 5  $\mu\text{L}$  y el caudal a 0,35  $\text{mL min}^{-1}$ . El espectrómetro de masas se hizo funcionar en monitoreo dinámico de reacción múltiple (dMRM) en modo de ionización de conmutación positivo a negativo. Los segmentos de tiempo se establecieron en 1 minuto para cada compuesto. La temperatura del gas de secado se ajustó a

325 °C, el flujo de gas a 10 L min<sup>-1</sup>, el nebulizador a 30 psi, la temperatura de la vaina del gas a 275 °C, el flujo de la vaina del gas a 10 L min<sup>-1</sup>, voltaje capilar a 3500 V y voltaje de la boquilla a 0 V. Los LOQ y LOD de la metodología y los parámetros instrumentales se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla A.3. Parámetros instrumentales usados para el análisis de los metabolitos de PFR.

Compuesto	Tr	IS <sub>2</sub>	precursor (m/z)	Producto (Q <sub>1</sub> , Q <sub>2</sub> )	EC <sup>55</sup>	VF <sup>56</sup>	VAC <sup>57</sup>	R <sup>2</sup>	LOD [ng L <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng L <sup>-1</sup> ]
HO-DPhP	2,95	DPhP-D <sub>10</sub>	265	93,0 108	-30 -50	-140	4	0,9930	2,3	8
DPhP	4,07	DPhP-D <sub>10</sub>	249	93,0 155	-30 -15	-146	4	0,9996	7,4	25
BCIPHIPP	5,87	TCEP-D <sub>12</sub>	309	99,0 175	17 4	59	4	0,9993	1,3	4,4
TCEP	6,23	TCEP-D <sub>12</sub>	285	63,0 99,0	29 21	110	4	0,9993	1,1	3,7
EHPHP	6,24	TCEP-D <sub>12</sub>	285	93,0 79,0	-40 -20	-152	4	0,9916	19	65
BBOEHEP	7,97	BBOEHEP-D <sub>4</sub>	343	45,0 243	17 4	88	4	0,9996	1,5	5
HO-TBOEP	9,09	BBOEHEP-D <sub>4</sub>	415	45,0 99,0	25 33	123	4	0,9930	11,7	39
HO-EHDPHP	9,58	TBOEP-D <sub>6</sub>	379	251 153	5 30	99	4	0,9980	0,5	1,6
BCIPP	2,71	BDCIPP-D <sub>10</sub>	249	35,0 251	5 5	60	4	0,992	4,6	15,4
BDCIPP	4,10	BDCIPP-D <sub>10</sub>	317	35,0 319	5 5	78	4	0,999	0,2	0,8
BBOEP	4,99	BBOEP-D <sub>4</sub>	297	79,0 197	25 10	118	4	0,998	0,4	1,2

<sup>55</sup> Energía de colisión

<sup>56</sup> Voltaje del fragmento

<sup>57</sup> Voltaje del acelerador de la celda

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] W. Xu, X. Wang, Z. Cai, Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review, *Anal. Chim. Acta.* 790 (2013). doi:10.1016/j.aca.2013.04.026.
- [2] P. Sudmalis, M.A. Baķe, J. Rotbergs, Detection of Persistent Organic Pollutants in Blood Serum of Electricians and Welders in Latvia, *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B Nat. Exact, Appl. Sci.* 70 (2016) 330–335. doi:10.1515/prolas-2016-0050.
- [3] M. Nadal, M. Marquès, M. Mari, J.L. Domingo, Climate change and environmental concentrations of POPs: A review, *Environ. Res.* 143 (2015) 177–185. doi:10.1016/j.envres.2015.10.012.
- [4] Anónimo, Actualización del plan nacional de aplicación del convenio de Estocolmo sobre los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en la República Argentina, 2017.
- [5] A. Covaci, B.J. De, J.J. Ryan, S. Voorspoels, P. Schepens, Determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue by large-volume injection-narrow-bore capillary gas chromatography/electron impact low-resolution mass spectrometry., *Anal. Chem.* 74 (2002) 790–8. doi:10.1021/ac010784e.
- [6] A.R. Fontana, M.F. Silva, L.D. Martínez, R.G. Wuilloud, J.C. Altamirano, Determination of polybrominated diphenyl ethers in water and soil samples by cloud point extraction-ultrasound-assisted back-extraction-gas chromatography-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4339–46. doi:10.1016/j.chroma.2009.03.029.
- [7] E. Eljarrat, D. Barceló, *Brominated Flame Retardants*, Springer London, Barcelona, Spain, 2011. doi:10.1007/698.
- [8] S. Boryniec, W. Przygocki, Polymer combustion processes. Part 1. Fundamental problems, *Prog. Rubber Plast. Technol.* 16 (2000) 193–210.
- [9] M. Alaee, P. Arias, A. Sjödin, Å. Bergman, An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release, *Environ. Int.* 29 (2003) 683–689. doi:10.1016/S0160-4120(03)00121-1.
- [10] T.D. Anderson, J.D. MacRae, Polybrominated diphenyl ethers in fish and wastewater samples from an area of the Penobscot River in Central Maine, *Chemosphere.* 62 (2006) 1153–1160. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.06.034.
- [11] L.G. Costa, G. Giordano, Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant?, *Neurotoxicology.* 32 (2011) 9–24. doi:10.1016/j.neuro.2010.12.010.
- [12] P.D. Noyes, H.M. Stapleton, PBDE flame retardants, *Endocr. Disruptors.* 2 (2014) e29430-1-e29430-25. doi:10.4161/endo.29430.
- [13] A.C. Dirtu, M. Abdallah, A. Covaci, Advances in the sample preparation of brominated flame retardants and other brominated compounds, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 189–203. doi:10.1016/j.trac.2012.10.004.
- [14] N.B. Lana, P. Berton, A. Covaci, A.G. Atencio, N.F. Ciocco, J.C. Altamirano, Ultrasound leaching-dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1285 (2013) 15–21. doi:10.1016/j.chroma.2013.02.027.

- [15] G. Yu, Q. Bu, Z. Cao, X. Du, J. Xia, M. Wu, J. Huang, Brominated flame retardants (BFRs): A review on environmental contamination in China, *Chemosphere*. 150 (2016) 479–490. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.12.034.
- [16] L.Y. Liu, K. He, R.A. Hites, A. Salamova, Hair and Nails as Noninvasive Biomarkers of Human Exposure to Brominated and Organophosphate Flame Retardants, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 3065–3073. doi:10.1021/acs.est.5b05073.
- [17] J. Llorca-Porcel, G. Martínez-Sánchez, B. Álvarez, M.A. Cobollo, I. Valor, Analysis of nine polybrominated diphenyl ethers in water samples by means of stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 569 (2006) 113–118. doi:10.1016/J.ACA.2006.03.100.
- [18] Z.J. Chen, H.Y. Liu, Z. Cheng, Y.B. Man, K.S. Zhang, W. Wei, J. Du, M.H. Wong, H.S. Wang, Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human samples of mother-newborn pairs in South China and their placental transfer characteristics, *Environ. Int.* 73 (2014) 77–84. doi:10.1016/j.envint.2014.07.002.
- [19] S. Król, B. Zabiegała, J. Namieśnik, PBDEs in environmental samples: Sampling and analysis, *Talanta*. 93 (2012) 1–17. doi:10.1016/j.talanta.2012.01.048.
- [20] M.M. Mitchell, R. Woods, L.-H. Chi, R.J. Schmidt, I.N. Pessah, P.J. Kostyniak, J.M. LaSalle, Levels of select PCB and PBDE congeners in human postmortem brain reveal possible environmental involvement in 15q11-q13 duplication autism spectrum disorder, *Environ. Mol. Mutagen.* 53 (2012) 589–598. doi:10.1002/em.21722.
- [21] A. Messer, Mini-review: Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants as potential autism risk factors, *Physiol. Behav.* 100 (2010) 245–249. doi:10.1016/j.physbeh.2010.01.011.
- [22] J. Tang, J.X. Zhai, Distribution of polybrominated diphenyl ethers in breast milk, cord blood and placentas: a systematic review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 21548–21573. doi:10.1007/s11356-017-9821-8.
- [23] A.M. Vuong, J.M. Braun, K. Yolton, C. Xie, G.M. Webster, A. Sjödin, K.N. Dietrich, B.P. Lanphear, A. Chen, Prenatal and postnatal polybrominated diphenyl ether exposure and visual spatial abilities in children, *Environ. Res.* 153 (2017) 83–92. doi:10.1016/J.ENVRES.2016.11.020.
- [24] U. Ali, A. Mahmood, J.H. Syed, J. Li, G. Zhang, A. Katsoyiannis, K.C. Jones, R.N. Malik, Assessing the combined influence of TOC and black carbon in soil–air partitioning of PBDEs and DPs from the Indus River Basin, Pakistan, *Environ. Pollut.* 201 (2015) 131–140. doi:10.1016/J.ENVPOL.2015.02.035.
- [25] T.J. McGrath, A.S. Ball, B.O. Clarke, Critical review of soil contamination by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and novel brominated flame retardants (NBFRs); concentrations, sources and congener profiles, *Environ. Pollut.* 230 (2017) 741–757. doi:10.1016/j.envpol.2017.07.009.
- [26] M. Commendatore, P. Yorio, L. Scenna, P.M. Ondarza, N. Suárez, C. Marinao, K.S.B. Miglioranza, Persistent organic pollutants in sediments, intertidal crabs, and the threatened Olrog's gull in a northern Patagonia salt marsh, Argentina, *Mar. Pollut. Bull.* 136 (2018) 533–546. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2018.09.010.
- [27] G. Yin, Y. Zhou, A. Strid, Z. Zheng, A. Bignert, T. Ma, Spatial distribution and bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in snails (*Bellamya aeruginosa*) and sediments from Taihu Lake area, China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 7740–7751. doi:10.1007/s11356-017-8467-x.
- [28] N. Tombesi, K. Pozo, M. Álvarez, P. Přebilová, P. Kukučka, O. Audy, J. Klánová, Tracking polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediments and soils from the southwest of Buenos Aires Province, Argentina (South

- eastern part of the GRULAC region), *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 1470–1476. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.013.
- [29] K.J. Fernie, R.J. Letcher, Waste-water treatment plants are implicated as an important source of flame retardants in insectivorous tree swallows (*Tachycineta bicolor*), *Chemosphere*. 195 (2018) 29–39. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.037.
- [30] D. Allende, M.F. Ruggeri, B. Lana, K. Garro, J. Altamirano, E. Puliafito, Inventory of primary emissions of selected persistent organic pollutants to the atmosphere in the area of Great Mendoza, *Emerg. Contam.* 2 (2016) 14–25. doi:10.1016/J.EMCON.2015.12.001.
- [31] C.N. Pegoraro, T. Harner, K. Su, M.S. Chiappero, Assessing levels of POPs in air over the South Atlantic Ocean off the coast of South America, *Sci. Total Environ.* 571 (2016) 172–177. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2016.07.149.
- [32] S.H. Yun, R. Addink, J.M. McCabe, A. Ostaszewski, D. Mackenzie-Taylor, A.B. Taylor, K. Kannan, Polybrominated Diphenyl Ethers and Polybrominated Biphenyls in Sediment and Floodplain Soils of the Saginaw River Watershed, Michigan, USA, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55 (2008) 1–10. doi:10.1007/s00244-007-9084-3.
- [33] M.N. Danon-Schaffer, J.R. Grace, M.G. Ikononou, PBDEs in waste disposal sites from Northern Canada, *Organoh Compd.* 70 (2008) 365–368. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84870892355&origin=inward>.
- [34] C.M.A. Iwegbue, S.B. Eyengho, F.E. Egbueze, E.W. Odali, G.O. Tesi, G.E. Nwajei, B.S. Martincigh, Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in indoor dust from electronic repair workshops in southern Nigeria: Implications for onsite human exposure, *Sci. Total Environ.* 671 (2019) 914–927. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.449.
- [35] Y. Hao, Y. Li, X. Han, T. Wang, R. Yang, P. Wang, K. Xiao, W. Li, H. Lu, J. Fu, Y. Wang, J. Shi, Q. Zhang, G. Jiang, Air monitoring of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers and organochlorine pesticides in West Antarctica during 2011–2017: Concentrations, temporal trends and potential sources, *Environ. Pollut.* 249 (2019) 381–389. doi:10.1016/J.ENVPOL.2019.03.039.
- [36] W. Zhang, P. Wang, Y. Zhu, R. Yang, Y. Li, D. Wang, J. Matsiko, X. Han, J. Zhao, Q. Zhang, J. Zhang, G. Jiang, Brominated flame retardants in atmospheric fine particles in the Beijing-Tianjin-Hebei region, China: Spatial and temporal distribution and human exposure assessment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171 (2019) 181–189. doi:10.1016/J.ECOENV.2018.12.080.
- [37] H. Demirtepe, I. Imamoglu, Levels of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in treatment plant sludge: Implications on sludge management, *Chemosphere*. 221 (2019) 606–615. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.01.060.
- [38] A.P. Ganci, C.H. Vane, M. Abdallah, T. Moehring, S. Harrad, Legacy PBDEs and NBRs in sediments of the tidal River Thames using liquid chromatography coupled to a high resolution accurate mass Orbitrap mass spectrometer, *Sci. Total Environ.* 658 (2019) 1355–1366. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.268.
- [39] L. Metelkova, Z. Zhakovskaya, G. Kukhareva, A. Rybalko, V. Nikiforov, Occurrence of PCDD/PCDFs, dioxin-like PCBs, and PBDEs in surface sediments from the Neva River and the Eastern Gulf of Finland (Russia), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 7375–7389. doi:10.1007/s11356-018-1945-y.
- [40] T.B. Chokwe, M.N. Magubane, O.A. Abafe, J.O. Okonkwo, I. V. Sibiya, Levels, distributions, and ecological risk assessments of polybrominated diphenyl ethers and alternative flame retardants in river sediments from Vaal River, South Africa, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 7156–7163. doi:10.1007/s11356-018-04063-4.
- [41] S. Lacorte, M.G. Ikononou, Occurrence and congener specific profiles of polybrominated

- diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia, *Chemosphere*. 74 (2009) 412–420. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.050.
- [42] P.M. Ondarza, M. Gonzalez, G. Fillmann, K.S.B. Miglioranza, PBDEs, PCBs and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin, Argentinean Patagonia, *Chemosphere*. 94 (2014) 135–142. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513013349> (accessed May 24, 2016).
- [43] J. Muñoz-Arnanz, A.D. Chirife, B. Galletti Vernazzani, E. Cabrera, M. Sironi, J. Millán, C.R.M. Attard, B. Jiménez, First assessment of persistent organic pollutant contamination in blubber of Chilean blue whales from Isla de Chiloé, southern Chile, *Sci. Total Environ*. 650 (2019) 1521–1528. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.070.
- [44] J. Wang, X. Zhao, Y. Wang, Z. Shi, Tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecane isomers and polybrominated diphenyl ethers in foodstuffs from Beijing, China: Contamination levels, dietary exposure and risk assessment, *Sci. Total Environ*. 666 (2019) 812–820. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.324.
- [45] L. Fu, J. Pei, Y. Zhang, X. Cheng, S. Long, L. Zeng, Polybrominated diphenyl ethers and alternative halogenated flame retardants in mollusks from the Chinese Bohai Sea: Levels and interspecific differences, *Mar. Pollut. Bull.* 142 (2019) 551–558. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2019.03.056.
- [46] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, Determination of polybrominated diphenyl ethers in human hair by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*. 78 (2009) 138–143. doi:10.1016/j.talanta.2008.10.054.
- [47] L. Gaston, D.J. Lapworth, M. Stuart, J. Arnscheidt, Prioritization Approaches for Substances of Emerging Concern in Groundwater: A Critical Review, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 6107–6122. doi:10.1021/acs.est.8b04490.
- [48] L. Hoferkamp, M.H. Hermanson, D.C.G. Muir, Current use pesticides in Arctic media; 2000-2007, *Sci. Total Environ*. 408 (2010) 2985–2994. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.11.038.
- [49] Z. Santolaria, T. Arruebo, A. Pardo, J.M. Matesanz, A. Bartolomé, J. Caixach, F.J. Lanaja, J.S. Urieta, Evaluation of Airborne Organic Pollutants in a Pyrenean Glacial Lake (The Sabocos Tarn), *Water, Air, Soil Pollut.* 226 (2015). doi:10.1007/s11270-015-2648-3.
- [50] T. Gouin, M. Shoeib, T. Harner, Atmospheric concentrations of current-use pesticides across south-central Ontario using monthly-resolved passive air samplers, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 8096–8104. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.05.070.
- [51] G. Ghesti Pivetta, M. do Carmo Cauduro Gastaldini, Presence of emerging contaminants in urban water bodies in southern Brazil, *J. Water Health.* 17 (2019) 329–337. doi:10.2166/wh.2019.092.
- [52] P.J. Barroso, J.L. Santos, J. Martín, I. Aparicio, E. Alonso, Emerging contaminants in the atmosphere: Analysis, occurrence and future challenges, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49 (2019) 104–171. doi:10.1080/10643389.2018.1540761.
- [53] D.D. Snow, D.A. Cassada, S. Biswas, A. Malakar, M. D'Alessio, L.J. Carter, R.D. Johnson, J.B. Sallach, Detection, occurrence, and fate of emerging contaminants in agricultural environments (2019), *Water Environ. Res.* 91 (2019) 1103–1113. doi:10.1002/wer.1204.
- [54] J. Yang, Y. Zhao, M. Li, M. Du, X. Li, Y. Li, A Review of a Class of Emerging Contaminants: The Classification, Distribution, Intensity of Consumption, Synthesis Routes, Environmental Effects and Expectation of Pollution Abatement to Organophosphate Flame Retardants (OPFRs), *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). doi:10.3390/ijms20122874.
- [55] F. Zhu, C. Zhu, C. Wang, C. Gu, Occurrence and Ecological Impacts of Microplastics in Soil Systems: A Review, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102 (2019) 741–749. doi:10.1007/s00128-019-02623-z.

- [56] J.S. LeNoir, L.L. McConnell, G.M. Fellers, T.M. Cahill, J.N. Seiber, Summertime transport of current-use pesticides from California's Central Valley to the Sierra Nevada Mountain Range, USA, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 2715–2722. doi:10.1002/etc.5620181210.
- [57] C. Wang, Q. Wu, C. Wu, Z. Wang, Determination of some organophosphorus pesticides in water and watermelon samples by microextraction prior to high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3231–3239. doi:10.1002/jssc.201100661.
- [58] M. Friend, J.C. Franson, Organophosphorus and Carbamate Pesticides, in: F. Man. Wildl. Dis. Birds, USGS, Washington D.C., 2012: pp. 287–294.
- [59] T. Liu, S. Xu, S. Lu, P. Qin, B. Bi, H. Ding, Y. Liu, X. Guo, X. Liu, A review on removal of organophosphorus pesticides in constructed wetland: Performance, mechanism and influencing factors, *Sci. Total Environ.* 651 (2019) 2247–2268. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.087.
- [60] S.O. Pehkonen, Q. Zhang, The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 32 (2002) 17–72.
- [61] A. Pérez-Ruzafa, S. Navarro, A. Barba, C. Marcos, M. Cámara, F. Salas, J. Gutiérrez, Presence of Pesticides throughout Trophic Compartments of the Food Web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain), *Mar. Pollut. Bull.* 40 (2000) 140–151. doi:10.1016/S0025-326X(99)00193-9.
- [62] T. Katagi, Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms, Springer New York, New York, NY, 2010. doi:10.1007/978-1-4419-1440-8.
- [63] J.E. Casida, The greening of pesticide-environment interactions: some personal observations., *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 487–93. doi:10.1289/ehp.1104405.
- [64] M. Sánchez-Guerra, N. Pérez-Herrera, B. Quintanilla-Vega, Organophosphorus pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches, *Toxicol. Mech. Methods.* 21 (2011) 681–691. doi:10.3109/15376516.2011.602130.
- [65] C.D. Klassen, Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 8th ed., Mc Graw Hill, Kansas, 2013.
- [66] T. Rasheed, M. Bilal, F. Nabeel, M. Adeel, H.M.N. Iqbal, Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment, *Environ. Int.* 122 (2019) 52–66. doi:10.1016/j.envint.2018.11.038.
- [67] Y. Farina, N. Munawar, M.P. Abdullah, M. Yaqoob, A. Nabi, Fate, distribution, and bioconcentration of pesticides impact on the organic farms of Cameron Highlands, Malaysia, *Environ. Monit. Assess.* 190 (2018) 386. doi:10.1007/s10661-018-6762-8.
- [68] P. Sarkhail, M. Yunesian, R. Ahmadkhaniha, P. Sarkheil, N. Rastkari, Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran, *DARU J. Pharm. Sci.* 20 (2012) 9. doi:10.1186/2008-2231-20-9.
- [69] X. Zhao, L. Bo, J. Wang, T. Li, Survey of seven organophosphorus pesticides in drinking water, feedstuffs and raw milk from dairy farms in the province heilongjiang during 2008-2009, *Milchwissenschaft.* 67 (2012) 293–296.
- [70] Y.Z. Wang, C. Lin, X.S. Zhou, Y. Zhang, C.G. Han, Occurrence, composition and ecological restoration of organic pollutants in water environment of South Canal, China, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 82 (2017) 012033. doi:10.1088/1755-1315/82/1/012033.
- [71] M.V. Russo, L. Campanella, P. Avino, Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. B.* 780 (2002) 431–441. doi:10.1016/S1570-0232(02)00629-3.

- [72] H. Mallatou, C.P. Pappas, E. Kondyli, T.A. Albanis, Pesticide residues in milk and cheeses from Greece, *Sci. Total Environ.* 196 (1997) 111–117. doi:10.1016/S0048-9697(96)05404-6.
- [73] H. Pan, H. Lei, X. He, B. Xi, Q. Xu, Spatial distribution of organochlorine and organophosphorus pesticides in soil-groundwater systems and their associated risks in the middle reaches of the Yangtze River Basin, *Environ. Geochem. Health.* (2017) 1–13. doi:10.1007/s10653-017-9970-1.
- [74] A.R. Fontana, A.B. Camargo, J.C. Altamirano, Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 6334–6341. doi:10.1016/j.chroma.2010.08.021.
- [75] G. Poma, C. Sales, B. Bruyland, C. Christia, S. Gosciny, J. Van Loco, A. Covaci, Occurrence of Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers (PFRs) in Belgian Foodstuffs and Estimation of the Dietary Exposure of the Adult Population, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 2331–2338. doi:10.1021/acs.est.7b06395.
- [76] I. van der Veen, J. de Boer, Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis, *Chemosphere.* 88 (2012) 1119–1153. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.067.
- [77] M. Bastiaensen, F. Xu, F. Been, N. Van den Eede, A. Covaci, Simultaneous determination of 14 urinary biomarkers of exposure to organophosphate flame retardants and plasticizers by LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7871–7880. doi:10.1007/s00216-018-1402-2.
- [78] G.L. Wei, D.Q. Li, M.N. Zhuo, Y.S. Liao, Z.Y. Xie, T.L. Guo, J.J. Li, S.Y. Zhang, Z.Q. Liang, Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure, *Environ. Pollut.* 196 (2015) 29–46. doi:10.1016/j.envpol.2014.09.012.
- [79] I. Pantelaki, D. Voutsas, Organophosphate flame retardants (OPFRs): A review on analytical methods and occurrence in wastewater and aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 649 (2019) 247–263. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.286.
- [80] A. Kucharska, A. Covaci, G. Vanermen, S. Voorspoels, Non-invasive biomonitoring for PFRs and PBDEs: New insights in analysis of human hair externally exposed to selected flame retardants, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 1062–1071. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.043.
- [81] H.M. Stapleton, S. Klosterhaus, S. Eagle, J. Fuh, J.D. Meeker, A. Blum, T.F. Webster, Detection of organophosphate flame retardants in furniture foam and U.S. house dust, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 7490–7495. doi:10.1021/es9014019.
- [82] A. Araki, I. Saito, A. Kanazawa, K. Morimoto, K. Nakayama, E. Shibata, M. Tanaka, T. Takigawa, T. Yoshimura, H. Chikara, Y. Saijo, R. Kishi, Phosphorus flame retardants in indoor dust and their relation to asthma and allergies of inhabitants, *Indoor Air.* 24 (2014) 3–15. doi:10.1111/ina.12054.
- [83] J.D. Meeker, E.M. Cooper, H.M. Stapleton, R. Hauser, Exploratory analysis of urinary metabolites of phosphorus-containing flame retardants in relation to markers of male reproductive health, *Endocr. Disruptors.* 1 (2013) e26306. doi:10.4161/endo.26306.
- [84] E. V. Preston, M.D. McClean, B. Claus Henn, H.M. Stapleton, L.E. Braverman, E.N. Pearce, C.M. Makey, T.F. Webster, Associations between urinary diphenyl phosphate and thyroid function, *Environ. Int.* 101 (2017) 158–164. doi:10.1016/j.envint.2017.01.020.
- [85] A. Araki, M. Bastiaensen, Y. Ait Bamai, N. Van den Eede, T. Kawai, T. Tsuboi, R.M. Ketema, A. Covaci, R. Kishi, Associations between allergic symptoms and phosphate flame retardants in dust and their urinary metabolites among school children, *Environ. Int.* 119 (2018) 438–446. doi:10.1016/J.ENVINT.2018.07.018.

- [86] Y. Zhang, X. Zheng, L. Wei, R. Sun, H. Guo, X. Liu, S. Liu, Y. Li, B. Mai, The distribution and accumulation of phosphate flame retardants (PFRs) in water environment, *Sci. Total Environ.* 630 (2018) 164–170. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.215.
- [87] F. Been, M. Bastiaensen, F.Y. Lai, K. Libousi, N.S. Thomaidis, L. Benaglia, P. Esseiva, O. Delémont, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, Mining the Chemical Information on Urban Wastewater: Monitoring Human Exposure to Phosphorus Flame Retardants and Plasticizers, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 6996–7005. doi:10.1021/acs.est.8b01279.
- [88] A. Kucharska, E. Cequier, C. Thomsen, G. Becher, A. Covaci, S. Voorspoels, Assessment of human hair as an indicator of exposure to organophosphate flame retardants. Case study on a Norwegian mother–child cohort, *Environ. Int.* 83 (2015) 50–57. doi:10.1016/j.envint.2015.05.015.
- [89] R. Sutton, D. Chen, J. Sun, D.J. Greig, Y. Wu, Characterization of brominated, chlorinated, and phosphate flame retardants in San Francisco Bay, an urban estuary, *Sci. Total Environ.* 652 (2019) 212–223. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.096.
- [90] E. Cequier, A.C. Ionas, A. Covaci, R. Maria, M. Marcé, G. Becher, C. Thomsen, Occurrence of a Broad Range of Legacy and Emerging Flame Retardants in Indoor Environments in Norway, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 6827–6835. doi:10.1021/es500516u.
- [91] S. Lee, W. Jeong, K. Kannan, H.B. Moon, Occurrence and exposure assessment of organophosphate flame retardants (OPFRs) through the consumption of drinking water in Korea, *Water Res.* 103 (2016) 182–188. doi:10.1016/j.watres.2016.07.034.
- [92] P. Berton, N.B. Lana, J.M. Ríos, J.F. García-Reyes, J.C. Altamirano, State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 905 (2016) 24–41. doi:10.1016/j.aca.2015.11.009.
- [93] G.P. de Pinho, A.A. Neves, M.E.L.R. de Queiroz, F.O. Silvério, Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography, *Food Control.* 21 (2010) 1307–1311. doi:10.1016/j.foodcont.2010.03.006.
- [94] L. Qian, Z. Hongguo, Y. Chongtian, Determination of Pesticide Residues in Drinking Water Using Automated Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection, *J. Thermo Sci.* (2006) 1–6.
- [95] A. Sarafraz-yazdi, A. Amiri, Liquid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1–14. doi:10.1016/j.trac.2009.10.003.
- [96] P.T. Anastas, Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167–175. doi:10.1080/10408349891199356.
- [97] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green Analytical Chemistry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 497–511. doi:10.1016/J.TRAC.2008.05.003.
- [98] S.L.Y. Tang, R.L. Smith, M. Poliakoff, Principles of green chemistry: PRODUCTIVELY, *Green Chem.* 7 (2005) 761. doi:10.1039/b513020b.
- [99] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 1–9. doi:10.1016/J.CHROMA.2006.03.007.
- [100] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2342–2357. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.088.
- [101] M. Saber Tehrani, M.H. Givianrad, N. Mahoor, K. Hara, H. Seno, O. Suzuki, K. Sato, C.K. Burnell, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, J. Logan, Surfactant-assisted dispersive liquid–liquid

- microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of amphetamine and methamphetamine in urine samples, *Anal. Methods*. 4 (2012) 1357. doi:10.1039/c2ay25125f.
- [102] A.S. Yazdi, Surfactant-based extraction methods, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 918–929. doi:10.1016/j.trac.2011.02.010.
- [103] A. Melnyk, L. Wolska, J. Namieśnik, Coacervative extraction as a green technique for sample preparation for the analysis of organic compounds., *J. Chromatogr. A*. 1339 (2014) 1–12. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.082.
- [104] H. Watanabe, H. Tanaka, A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid–liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, *Talanta*. 25 (1978) 585–589. doi:10.1016/0039-9140(78)80151-9.
- [105] T. Saitoh, M. Yamaguchi, M. Hiraide, Surfactant-coated aluminum hydroxide for the rapid removal and biodegradation of hydrophobic organic pollutants in water, *Water Res.* 45 (2011) 1879–1889. doi:10.1016/j.watres.2010.12.009.
- [106] B.K. Tiwari, Ultrasound: a clean, green extraction technology, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 100–109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013.
- [107] K. Jurowski, K. Kochan, J. Walczak, W. Piekoszewski, Trends in Analytical Chemistry Comprehensive review of trends and analytical strategies applied for biological samples preparation and storage in modern medical lipidomics : State of the art, 86 (2017) 276–289.
- [108] A. Melnyk, J. Namies, Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 282–292. doi:10.1016/j.trac.2015.03.013.
- [109] J. Pawliszyn, H. Lord, Handbook of sample preparation, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2010. doi:10.1002/9780813823621.ch23.
- [110] A. Covaci, S. Voorspoels, Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*. 827 (2005) 216–223. doi:10.1016/j.jchromb.2005.09.020.
- [111] Z.I. Figueroa, H.A. Young, J.D. Meeker, S.E. Martenies, D.B. Barr, G. Gray, M.J. Perry, Dialkyl phosphate urinary metabolites and chromosomal abnormalities in human sperm, *Environ. Res.* 143 (2015) 256–265. doi:10.1016/j.envres.2015.10.021.
- [112] J. Gustavsson, K. Wiberg, E. Ribeli, M.A. Nguyen, S. Josefsson, L. Ahrens, Screening of organic flame retardants in Swedish river water, *Sci. Total Environ.* 625 (2018) 1046–1055. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.12.281.
- [113] X. Liu, J. Li, Z. Zhao, W. Zhang, K. Lin, C. Huang, X.X. Wang, Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination for polybrominated diphenyl ethers in different environmental matrices, *J. Chromatogr. A*. 1216 (2009) 2220–2226. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.092.
- [114] B.C. Kelly, J.D. Blair, F. a P.C. Gobas, M.G. Ikonou, Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in a Canadian Arctic marine food web., *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 7069–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18939528>.
- [115] M. Bergant, R. Milačič, J. Ščančar, Determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum by gas chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1572 (2018) 112–118. doi:10.1016/J.CHROMA.2018.08.043.
- [116] S. Lacorte, M. Guillamon, Validation of a pressurized solvent extraction and GC-NCI-MS method for the low level determination of 40 polybrominated diphenyl ethers in mothers' milk, *Chemosphere*. 73 (2008) 70–75. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.021.

- [117] P. Labadie, F. Alliot, C. Bourges, A. Desportes, M. Chevreuil, Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons, *Anal. Chim. Acta.* 675 (2010) 97–105. doi:10.1016/j.aca.2010.07.010.
- [118] N. Negreira, J. Cobas, N. Carro, Optimization of Soxtec extraction procedure for determination of polybrominated diphenyl ethers in bivalve mollusc, *J. Anal. Chem.* 70 (2015) 804–813. doi:10.1134/S1061934815050111.
- [119] D. Butryn, M. Gross, L.-H. Chi, A. Schecter, J. Olson, D. Aga, “One-shot” analysis of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated analogs in human breast milk and serum using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 892 (2015) 140–147. doi:10.1016/j.aca.2015.08.026.
- [120] H.M. Stapleton, Instrumental methods and challenges in quantifying polybrominated diphenyl ethers in environmental extracts: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 807–817. doi:10.1007/s00216-006-0400-y.
- [121] I. Fulara, M. Czaplicka, Methods for determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental samples - Review, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2075–2087. doi:10.1002/jssc.201200100.
- [122] M. Shao, J. Jiang, M. Li, L. Wu, M. Hu, Recent developments in the analysis of polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in plastic, *Rev. Anal. Chem.* 35 (2016) 133–143. doi:10.1515/revac-2016-0012.
- [123] D. Barceló, Occurrence, Handling and Chromatographic Determination of Pesticides in the Aquatic Environment A Review, *Analyst.* 116 (1991) 681–689.
- [124] Y. Li, G. Wei, X. Wang, Determination of decabromodiphenyl ether in water samples by single-drop microextraction and RP-HPLC, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2698–2702. doi:10.1002/jssc.200700188.
- [125] C. Yu, B. Hu, Novel combined stir bar sorptive extraction coupled with ultrasonic assisted extraction for the determination of brominated flame retardants in environmental samples using high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1160 (2007) 71–80. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.042.
- [126] R.A. Pérez, J.L. Tadeo, B. Albero, E. Miguel, C. Sánchez-Brunete, Gas chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry for analysis of selected polyhalogenated pollutants in plants. Comparison of extraction methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 389–400. doi:10.1007/s00216-012-6465-x.
- [127] Q. Xiao, B. Hu, J. Duan, M. He, W. Zu, Analysis of PBDEs in Soil, Dust, Spiked Lake Water, and Human Serum Samples by Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction Combined with GC-ICP-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1740–1748. doi:10.1016/j.jasms.2007.07.006.
- [128] H. Liu, M. Zhang, X. Wang, Y. Zou, W. Wang, M. Ma, Y. Li, H. Wang, Extraction and determination of polybrominated diphenyl ethers in water and urine samples using solidified floating organic drop microextraction along with high performance liquid chromatography, *Microchim. Acta.* 176 (2012) 303–309. doi:10.1007/s00604-011-0713-1.
- [129] Y. Wang, Y. Sun, T. Chen, Z. Shi, X. Zhou, Z. Sun, L. Zhang, J. Li, Determination of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in human serum by gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1099 (2018) 64–72. doi:10.1016/J.JCHROMB.2018.09.015.
- [130] A.R. Fontana, N.B. Lana, L.D. Martinez, J.C. Altamirano, Ultrasound-assisted leaching-dispersive solid-phase extraction followed by liquid – liquid microextraction for the

- determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatography – tandem mass spectrometry, *Talanta*. 82 (2010) 359–366. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.050.
- [131] L. Xiang, H. Sheng, Y. Bian, J. Kang, X. Yang, A. Herzberger, F. Suanon, F. Wang, Optimization of Sample Pretreatment based on Graphene Oxide Dispersed Acid Silica Gel for Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers in Vegetables near an E-waste Recycling Plant, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2019) 1–5. doi:10.1007/s00128-019-02547-8.
- [132] a. Martínez, M. Ramil, R. Montes, D. Hernanz, E. Rubí, I. Rodríguez, R.C. Torrijos, Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr. A*. 1072 (2005) 83–91. doi:10.1016/j.chroma.2004.12.034.
- [133] Y. Li, G. Wei, J. Hu, X. Liu, X. Zhao, X. Wang, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples, *Anal. Chim. Acta*. 615 (2008) 96–103. doi:10.1016/j.aca.2008.03.038.
- [134] A.R. Fontana, A. Camargo, L.D. Martinez, J.C. Altamirano, Dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up technique for biological sample extracts. Determination of polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 2490–2496. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.058.
- [135] C. Wu, N. Liu, Q. Wu, C. Wang, Z. Wang, Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples, *Anal. Chim. Acta*. 679 (2010) 56–62. doi:10.1016/j.aca.2010.09.009.
- [136] D. Lu, C. Liu, J. Deng, X. Zhou, G. Shi, T. Zhou, Rational design of an ionic liquid dispersive liquid–liquid micro-extraction method for the detection of organophosphorus pesticides, *Analyst*. 144 (2019) 2166–2172. doi:10.1039/C9AN00123A.
- [137] R. Kaur, R. Kaur, S. Rani, A.K. Malik, A. Kabir, K.G. Furton, Application of fabric phase sorptive extraction with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of organophosphorus pesticides in selected vegetable samples, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 862–870. doi:10.1002/jssc.201800854.
- [138] I. Notardonato, M.V. Russo, M. Vitali, C. Protano, P. Avino, Analytical Method Validation for Determining Organophosphorus Pesticides in Baby Foods by a Modified Liquid–Liquid Microextraction Method and Gas Chromatography–Ion Trap/Mass Spectrometry Analysis, *Food Anal. Methods*. 12 (2019) 41–50. doi:10.1007/s12161-018-1335-6.
- [139] R. Zhang, Z.-C. Tan, K.-C. Huang, Y. Wen, X.-Y. Li, J.-L. Zhao, C.-L. Liu, R. Zhang, Z.-C. Tan, K.-C. Huang, Y. Wen, X.-Y. Li, J.-L. Zhao, C.-L. Liu, A Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by UPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of Pesticides and Aflatoxins in Herbal Tea, *Molecules*. 24 (2019) 1029. doi:10.3390/molecules24061029.
- [140] V.C. Fernandes, M. Freitas, J.P.G. Pacheco, J.M. Oliveira, V.F. Domingues, C. Delerue-Matos, Magnetic dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography determination of organophosphorus pesticides in strawberries, *J. Chromatogr. A*. 1566 (2018) 1–12. doi:10.1016/J.CHROMA.2018.06.045.
- [141] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, In situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of organophosphorus pesticides, *J. Chromatogr. A*. 1559 (2018) 95–101. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.12.059.

- [142] M. Kermani, M.T. Jafari, M. Saraji, Porous magnetized carbon sheet nanocomposites for dispersive solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides prior to analysis by gas chromatography-ion mobility spectrometry, *Microchim. Acta.* 186 (2019) 88. doi:10.1007/s00604-018-3215-6.
- [143] L. Liu, Y. Jiang, L. Yong, B. Hu, L. Zhu, Y. Wang, C. Li, Z. Feng, D. Zhou, C. Sun, MWCNTs-solid phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of eleven organophosphorus pesticides in river water, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 98 (2018) 743–757. doi:10.1080/03067319.2018.1502284.
- [144] P. Wang, M. Luo, D. Liu, J. Zhan, X. Liu, F. Wang, Z. Zhou, P. Wang, Application of a magnetic graphene nanocomposite for organophosphorus pesticide extraction in environmental water samples, *J. Chromatogr. A.* 1535 (2018) 9–16. doi:10.1016/J.CHROMA.2018.01.003.
- [145] P. Sun, Y.L. Gao, C. Xu, Y.F. Lian, Determination of six organophosphorus pesticides in water samples by three-dimensional graphene aerogel-based solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry, *RSC Adv.* 8 (2018) 10277–10283. doi:10.1039/C7RA13316B.
- [146] W. Liu, J. Quan, Z. Hu, Detection of Organophosphorus Pesticides in Wheat by Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with HPLC, *J. Anal. Methods Chem.* 2018 (2018) 1–10. doi:10.1155/2018/8916393.
- [147] Y.-B. Xiong, Y. Zhao, Z.-H. Yang, Development of Manual Shaking and Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Microextraction for Analysis of Organophosphorus Pesticides in Aqueous Samples, *Artic. J. Braz. Chem. Soc.* 28 (2017) 2421–2428. doi:10.21577/0103-5053.20170096.
- [148] S. Zhang, X. Liu, J. Qin, M. Yang, H. Zhao, Y. Wang, W. Guo, Z. Ma, W. Kong, Rapid gas chromatography with flame photometric detection of multiple organophosphorus pesticides in *Salvia miltiorrhizae* after ultrasonication assisted one-step extraction, *J. Chromatogr. B.* 1068–1069 (2017) 233–238. doi:10.1016/J.JCHROMB.2017.10.025.
- [149] Z. Cheng, F. Dong, J. Xu, X. Liu, X. Wu, Z. Chen, X. Pan, J. Gan, Y. Zheng, Simultaneous determination of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables using atmospheric pressure gas chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Food Chem.* 231 (2017) 365–373. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.157.
- [150] L. Vera Candiotti, M.M. De Zan, M.S. Cámara, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta.* 124 (2014) 123–138. doi:10.1016/j.talanta.2014.01.034.
- [151] S.L.C. Ferreira, V.A. Lemos, V.S. de Carvalho, E.G.P. da Silva, A.F.S. Queiroz, C.S.A. Felix, D.L.F. da Silva, G.B. Dourado, R. V. Oliveira, Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview, *Microchem. J.* 140 (2018) 176–182. doi:10.1016/J.MICROC.2018.04.002.
- [152] S. Gorji, P. Biparva, M. Bahram, G. Nematzadeh, Stir bar sorptive extraction kit for determination of pesticides in water samples with chemometric data processing, *Microchem. J.* 148 (2019) 313–321. doi:10.1016/J.MICROC.2019.04.056.
- [153] H. Hajian, N.K.N. Al-Shorgani, S.R.S. Abdullah, W.M.W. Yusoff, Optimization of itaconic acid production by *Aspergillus terreus* SUK-1 using Response Surface Methodology, *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* (2017).
- [154] S. Ateş, B. Türk, E. Bayraktar, A. Güvenç, Enhanced ethyl butyrate production using immobilized lipase, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* (2013). doi:10.3109/10731199.2012.743902.
- [155] L.L. Chaves, S.A. Costa Lima, A.C.C. Vieira, L. Barreiros, M.A. Segundo, D. Ferreira, B.

- Sarmiento, S. Reis, Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2018). doi:10.1016/j.ejps.2017.11.004.
- [156] B.E.L. Baêta, D.R.S. Lima, O.F.H. Adarme, L.V.A. Gurgel, S.F. de Aquino, Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept, *Bioresour. Technol.* (2016). doi:10.1016/j.biortech.2015.10.003.
- [157] S.L.C. Ferreira, A.O. Caires, T. da S. Borges, A.M.D.S. Lima, L.O.B. Silva, W.N.L. dos Santos, Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs, *Microchem. J.* 131 (2017) 163–169. doi:10.1016/J.MICROC.2016.12.004.
- [158] B. Magnusson, U. Örnemark, *Eurachem Guide: The fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory guide to method validation and related topics*, 2 nd, Eurachem, 2014.
- [159] L. Shen, H. Farid, M.A. Mcpeek, *Chromatographic Analysis of the Environment-Mass Spectrometry Based Approaches*, 4th ed., CRC Press, New York and London, 2017.
- [160] J. Vessman, R.I. Stefan, J.F. Van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D.T. Burns, A. Fajgelj, H. Müller, Selectivity in analytical chemistry: (IUPAC Recommendations 2001), *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1381–1386. doi:10.1351/pac200173081381.
- [161] A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson, Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, *Accredit. Qual. Assur.* 12 (2007) 45–47. doi:10.1007/s00769-006-0191-z.
- [162] L. Cuadros-Rodríguez, M.G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, A. González-Casado, A.M. Gómez-Sáez, Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences, *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 33–46. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.030.
- [163] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Anal. Chim. Acta.* 391 (1999) 105–126. doi:10.1016/S0003-2670(99)00104-X.
- [164] D.J. Tobin, *Hair in toxicology : an important bio-monitor*, Royal Society of Chemistry, 2005.
- [165] A. Alves, A. Kucharska, C. Erratico, F. Xu, E. Den Hond, G. Koppen, G. Vanermen, A. Covaci, S. Voorspoels, Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4063–4088. doi:10.1007/s00216-014-7748-1.
- [166] D. Lu, C. Feng, Y. Lin, D. Wang, H.S.S. Ip, X. Qiu, G. Wang, J. She, Determination of organochlorines, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human hair: Estimation of external and internal exposure, *Chemosphere.* 114 (2014) 327–336. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.109.
- [167] Y. Han, X. Jia, T. Duan, H. Chen, Combination of saponification with in-tube liquid–liquid extraction and dispersive liquid–liquid microextraction for determination of polybrominated diphenyl ethers in whole milk by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Methods.* 3 (2011) 842–848. doi:10.1039/c0ay00742k.
- [168] A. Covaci, P. Schepens, Chromatographic aspects of the analysis of selected persistent organochlorine pollutants in human hair, *Chromatographia.* 53 (2001) S366–S371. doi:10.1007/BF02490358.
- [169] S.E. Breidi, J. Barker, A. Petróczi, D.P. Naughton, Enzymatic digestion and selective quantification of underivatised delta-9-tetrahydrocannabinol and cocaine in human hair using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Methods Chem.* 2012 (2012) 1–7. doi:10.1155/2012/907893.
- [170] K.W. Schramm, Hair-biomonitoring of organic pollutants, *Chemosphere.* 72 (2008) 1103–

1111. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.017.
- [171] H. D'Havé, A. Covaci, J. Scheirs, P. Schepens, R. Verhagen, W. De Coen, Hair as an indicator of endogenous tissue levels of brominated flame retardants in mammals, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 6016–6020. doi:10.1021/es0507259.
- [172] S. Król, B. Zabiegała, J. Namieśnik, Human hair as a biomarker of human exposure to persistent organic pollutants (POPs), *TrAC Trends Anal. Chem.* 47 (2013) 84–98. doi:10.1016/j.trac.2013.02.010.
- [173] J.C. Cheong, S. Suh, B.J. Ko, J. Il Lee, J.Y. Kim, Y.J. Suh, M.K. In, Screening method for the detection of methamphetamine in hair using fluorescence polarization immunoassay, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 217–221. doi:10.1093/jat/bkt011.
- [174] S. Havey, G. Jereb, S. Katz, B. Poljšak, J. Štupar, Efficacy of hair analysis for evaluating heavy metal poisoning: A review, 9 (2014) 27–33.
- [175] H.S. Shin, H. Pyo, S.J. Park, Determination of persistent organochlorine pollutants in rat hair by gas chromatography-mass spectrometry, *Bull. Korean Chem. Soc.* 25 (2004) 1489–1494. doi:10.5012/bkcs.2004.25.10.1489.
- [176] H. Rushing, A. Karl, J. Wisnowski, *Design and Analysis of Experiments by Douglas Montgomery: A supplement for using JMP*, 1st ed., SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2013. doi:10.1007/b97673.
- [177] C.R. Robbins, *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, 4th, ilustra ed., Springer Science & Business Media, 2006.
- [178] R.G. Brereton, *Applied Chemometrics for Scientists*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2007. doi:10.1002/9780470057780.
- [179] *Analytic Methods for Design Practice*, Springer London, London, 2007. doi:10.1007/978-1-84628-473-1.
- [180] M. Moradi, Y. Yamini, A. Esrafil, S. Seidi, Application of surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction for sample preparation of chlorophenols in water samples, *Talanta*. 82 (2010) 1864–1869. doi:10.1016/J.TALANTA.2010.08.002.
- [181] B.-Y. Lu, J.-Y. Chang, Rapid and irreversible reduction of protein disulfide bonds, *Anal. Biochem.* 405 (2010) 67–72. doi:10.1016/J.AB.2010.05.011.
- [182] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, M.A. Meyers, Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration, *Prog. Mater. Sci.* 76 (2016) 229–318. doi:10.1016/J.PMATSCI.2015.06.001.
- [183] R.D. Goldman, P.M. Steinert, *Cellular and molecular biology of intermediate filaments*, *Ilustrada*, Springer Science & Business Media, New York, NY, 2013.
- [184] C. Cai, J. Chen, J. Qi, Y. Yin, X. Zheng, Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain., *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9 (2008) 713–720. doi:10.1631/jzus.B0820128.
- [185] K.M. Höld, D.L. Hubbard, D.G. Wilkins, D.E. Rollins, Quantitation of Cocaine in Human hair: The Effect of Centrifugation of Hair Digests., *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 414–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788514>.
- [186] R.C. de Guzman, M.R. Merrill, J.R. Richter, R.I. Hamzi, O.K. Greengauz-Roberts, M.E. Van Dyke, Mechanical and biological properties of keratose biomaterials, *Biomaterials*. 32 (2011) 8205–8217. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.054.
- [187] Q. Zhang, T. Liang, L. Guan, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical ionization mode for the determination of polybrominated diphenyl ethers in water, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1263–1269. doi:10.1002/jssc.201201049.

- [188] H. Genckal, C. Tari, Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 703–710. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.12.004.
- [189] I.P. Román, A. Chisvert Alberto, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2467–2475. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.047.
- [190] H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, 2nd ed., Wiley, 2009.
- [191] P.R. Brown, *Advances in Chromatography*, CRC Press, 1997. <https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=Tqz3RHi70coC&oi=fnd&pg=PA205&dq=GC-ECD+%22HALOGENated+SOLVENT%22&ots=XyGh6sQxZC&sig=GUzkHfw5aDt40X2K2KUaRVpX9Vg#v=onepage&q=halogenated&f=false> (accessed November 12, 2019).
- [192] S. Losada, F.J. Santos, A. Covaci, M.T. Galceran, Gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry method for the analysis of methoxylated polybrominated diphenyl ethers in fish, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 5253–5260. doi:10.1016/j.chroma.2010.06.023.
- [193] U. Gill, A. Covaci, J.J. Ryan, A. Emond, Determination of persistent organohalogenated pollutants in human hair reference material (BCR 397): An interlaboratory study, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 924–929. doi:10.1007/s00216-004-2855-z.
- [194] S. Mahpishanian, H. Sereshti, Three-dimensional graphene aerogel-supported iron oxide nanoparticles as an efficient adsorbent for magnetic solid phase extraction of organophosphorus pesticide residues in fruit juices followed by gas chromatographic determination, *J. Chromatogr. A.* 1443 (2016) 43–53. doi:10.1016/j.chroma.2016.03.046.
- [195] J. Stocka, M. Tankiewicz, M. Biziuk, J. Namieśnik, Green aspects of techniques for the determination of currently used pesticides in environmental samples., *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 7785–805. doi:10.3390/ijms12117785.
- [196] T. Saitoh, M. Saitoh, C. Hattori, M. Hiraide, Rapid removal of cationic dyes from water by coprecipitation with aluminum hydroxide and sodium dodecyl sulfate, *J. Environ. Chem. Eng.* 2 (2014) 752–758. doi:10.1016/j.jece.2013.11.015.
- [197] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Supramolecular assemblies for extracting organic compounds, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470–485. doi:10.1016/S0165-9936(03)00706-4.
- [198] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, Flotation of polycyclic aromatic hydrocarbons coprecipitated with aluminum hydroxide containing sodium dodecyl sulfate and magnesium, *Colloids Surfaces A-Physicochemical Eng. Asp.* 299 (2007) 88–92. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.11.025.
- [199] X. Xiao, X. Chen, X. Xu, G. Li, Co-precipitation assisted cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of estrogens in water and cosmetic samples, *Anal. Methods.* 5 (2013) 6376–6381. doi:10.1039/c3ay41372a.
- [200] P. Qi, Z. an Liang, Y. Wang, J. Xiao, J. Liu, Q. qiong Zhou, C. hao Zheng, L. ni Luo, Z. hao Lin, F. Zhu, X. wu Zhang, Mixed hemimicelles solid-phase extraction based on sodium dodecyl sulfate-coated nano-magnets for selective adsorption and enrichment of illegal cationic dyes in food matrices prior to high-performance liquid chromatography-diode array detection, *J. Chromatogr. A.* 1437 (2016) 25–36. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.005.
- [201] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, Aerosol-OT-gamma-alumina admicelles for the concentration of hydrophobic organic compounds in water, *J. Chromatogr. A.* 1040 (2004) 185–191. doi:10.1016/j.chroma.2004.04.010.

- [202] N. Blangenois, M. Florea, P. Grange, R.P. Silvy, S.P. Chenakin, J.M. Bastin, N. Kruse, B.P. Barbero, L. Cadús, Influence of the co-precipitation pH on the physico-chemical and catalytic properties of vanadium aluminum oxide catalyst, *Appl. Catal. A Gen.* 263 (2004) 163–170. doi:10.1016/j.apcata.2003.12.008.
- [203] T. Saitoh, K. Taguchi, M. Hiraide, Evaluation of hydrophobic properties of sodium dodecylsulfate / gamma-alumina admicelles based on fluorescence spectra of N-phenyl-1-naphthylamine, *Anal. Chim. Acta.* 454 (2002) 203–208.
- [204] L. Zhang, F. Chen, W. Zhang, C. Pan, Analysis of Six Organophosphorus Pesticide Residues in Apples and Pears Using Cloud-point Extraction Coupled with HPLC-UV, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 1202–1205. doi:10.5740/jaoacint.12-138.
- [205] K. Hu, A.J. Bard, Characterization of Adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate on Charge-Regulated Substrates by Atomic Force Microscopy Force Measurements, *Langmuir.* 13 (1997) 5418–5425. doi:10.1021/la970483t.
- [206] World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality: Recommendations volume 1, 3rd ed.*, Geneva, Switzerland, 2004.
- [207] G.W. Latimer, *Official Methods of Analysis of AOAC international, 20th ed.*, AOAC International, U.S., 2016.
- [208] A. Gure, N. Megersa, N. Retta, Ion-pair assisted liquid–liquid extraction for selective separation and analysis of multiclass pesticide residues in environmental waters, *Anal. Methods.* 6 (2014) 4633. doi:10.1039/c4ay00285g.
- [209] K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit, P. Soisungnoen, S. Srijaranai, Cationic surfactant ambient cloud point extraction and high-performance liquid chromatography for simultaneous analysis of organophosphorus pesticide residues in water and fruit juice samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1703–1712. doi:10.1007/s00216-011-5214-x.
- [210] C. Li, L. Chen, W. Li, Magnetic titanium oxide nanoparticles for hemimicelle extraction and HPLC determination of organophosphorus pesticides in environmental water, *Microchim. Acta.* 180 (2013) 1109–1116. doi:10.1007/s00604-013-1029-0.
- [211] G. Poma, Y. Liu, M. Cuykx, B. Tang, X.J. Luo, A. Covaci, Occurrence of organophosphorus flame retardants and plasticizers in wild insects from a former e-waste recycling site in the Guangdong province, South China, *Sci. Total Environ.* 650 (2019) 709–712. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.067.
- [212] F. Been, M. Bastiaensen, F.Y. Lai, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Biomarkers of Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Wastewater to Monitor Community-Wide Exposure, *Anal. Chem.* 89 (2017) 10045–10053. doi:10.1021/acs.analchem.7b02705.
- [213] M.E. Ingle, L. Mínguez-Alarcón, C.C. Carignan, C.M. Butt, H.M. Stapleton, P.L. Williams, J.B. Ford, R. Hauser, J.D. Meeker, The association between urinary concentrations of phosphorous-containing flame retardant metabolites and semen parameters among men from a fertility clinic, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 221 (2018) 809–815. doi:10.1016/J.IJHEH.2018.05.001.
- [214] C. Bergh, R. Torgrip, C. Östman, Simultaneous selective detection of organophosphate and phthalate esters using gas chromatography with positive ion chemical ionization tandem mass spectrometry and its application to indoor air and dust, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2859–2867. doi:10.1002/rcm.4690.
- [215] M. Velázquez-Gómez, E. Hurtado-Fernández, S. Lacorte, Comprehensive method for the analysis of multi-class organic micropollutants in indoor dust, *Sci. Total Environ.* 635 (2018) 1484–1494. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.04.186.
- [216] M. Lorenzo, J. Campo, M. Morales Suárez-Varela, Y. Picó, Occurrence, distribution and

- behavior of emerging persistent organic pollutants (POPs) in a Mediterranean wetland protected area, *Sci. Total Environ.* 646 (2019) 1009–1020. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.304.
- [217] S. Voorspoels, A. Kucharska, A. Covaci, G. Vanermen, Development of a broad spectrum method for measuring flame retardants - Overcoming the challenges of non-invasive human biomonitoring studie, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6665–6675. doi:10.1007/s00216-014-8106-z.
- [218] F. Been, M. Bastiaensen, F.Y. Lai, A.L.N. Van Nuijs, A. Covaci, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Biomarkers of Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Wastewater to Monitor Community-Wide Exposure, *Anal. Chem.* 89 (2017) 10045–10053. doi:10.1021/acs.analchem.7b02705.
- [219] M.L. Brusseau, G.B. Famisan, J.F. Artiola, Chemical contaminants, *Environ. Monit. Charact.* (2004) 299–312. doi:10.1016/B978-012064477-3/50018-7.
- [220] F.A. Kibuye, H.E. Gall, K.R. Elkin, B. Ayers, T.L. Veith, M. Miller, S. Jacob, K.R. Hayden, J.E. Watson, H.A. Elliott, Fate of pharmaceuticals in a spray-irrigation system: From wastewater to groundwater, *Sci. Total Environ.* 654 (2019) 197–208. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.442.
- [221] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res.* 72 (2014). doi:10.1016/j.watres.2014.08.053.
- [222] R. Kumar, B. Tschärke, J. O'Brien, J.F. Mueller, C. Wilkins, L.P. Padhye, Assessment of drugs of abuse in a wastewater treatment plant with parallel secondary wastewater treatment train, *Sci. Total Environ.* 658 (2019) 947–957. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.167.
- [223] B. Li, S.J. Sun, C.Y. Huo, W.L. Li, N.Z. Zhu, H. Qi, L.J. Kong, Y.F. Li, W.L. Ma, Occurrence and fate of PBDEs and novel brominated flame retardants in a wastewater treatment plant in Harbin, China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 19246–19256. doi:10.1007/s11356-016-7142-y.
- [224] Z. Lu, S.A. Smyth, A.O. De Silva, Distribution and fate of synthetic phenolic antioxidants in various wastewater treatment processes in Canada, *Chemosphere.* 219 (2019) 826–835. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.12.068.
- [225] W. Richard, G.M. Coreen, H. John, Quantitative determination of 13 organophosphorous flame retardants and plasticizers in a wastewater treatment system by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (2015). doi:10.1016/j.chroma.2015.04.026.
- [226] S. Sun, L. Jia, B. Li, A. Yuan, L. Kong, H. Qi, W. Ma, A. Zhang, Y. Wu, The occurrence and fate of PAHs over multiple years in a wastewater treatment plant of Harbin, Northeast China, *Sci. Total Environ.* 624 (2018) 491–498. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.029.
- [227] A. Ballesteros-Gómez, C.A. Erratico, N. Van den Eede, A.C. Ionas, P.E.G. Leonards, A. Covaci, In vitro metabolism of 2-ethylhexyldiphenyl phosphate (EHDPHP) by human liver microsomes, *Toxicol. Lett.* 232 (2015) 203–212. doi:10.1016/j.toxlet.2014.11.007.
- [228] J.A. Andresen, A. Grundmann, K. Bester, Organophosphorus flame retardants and plasticisers in surface waters, *Sci. Total Environ.* 332 (2004) 155–166. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.04.021.
- [229] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. Gonzalez, Cloud-point preconcentration and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371 (2001) 526–531. doi:10.1007/s002160101009.

- [230] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, An Acid-Induced Phase Cloud Point Separation Approach Using Anionic Surfactants for the Extraction and Preconcentration of Organic Compounds, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519–4526. doi:10.1021/ac990106g.
- [231] S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, L. Ma, Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-p-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC., *Anal. Chem.* 68 (1996) 1556–1560. doi:10.1021/ac951028+.
- [232] T. Liu, P. Cao, J. Geng, J. Li, M. Wang, M. Wang, X. Li, D. Yin, Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography., *Food Chem.* 142 (2014) 358–64. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.062.
- [233] N.B. Lana, A.R. Fontana, N.F. Ciocco, J.C. Altamirano, Determination of polybrominated diphenyl ethers in water samples from Mendoza River Basin by HS-SPME-GC-MS/MS, *Rev. La Fac. Ciencias Agrar. Univ. Nac. Cuyo.* 42 (2010) 85–98.
- [234] P.F. Fox, A.L. Kelly, Chemistry and Biochemistry of Milk Constituents, *Food Biochem. Food Process.* (2012) 442–464. doi:10.1002/9781118308035.ch24.
- [235] T. Uniacke-Lowe, P.F. Fox, *Equid Milk: Chemistry, Biochemistry and Processing*, *Food Biochem. Food Process.* (2012) 491–530. doi:10.1002/9781118308035.ch26.
- [236] J.L. Luque-García, M.D. Luque De Castro, Ultrasound: A powerful tool for leaching, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41–47. doi:10.1016/S0165-9936(03)00102-X.
- [237] M.F. Silva, P.M. Ondarza, M. Gonzalez, R. Da Cuña, F. Mejjide, F. Grosman, P. Sanzano, F.L. Lo Nostro, K.S.B. Miglioranza, Persistent organic pollutants (POPs) in fish with different feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem, *Sci. Total Environ.* 550 (2016) 900–909. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.176.
- [238] M.F. Silva Barni, M. Gonzalez, K.S.B. Miglioranza, Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 99 (2014) 45–53. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.10.012.
- [239] M.L. Ballesteros, K.S.B. Miglioranza, M. Gonzalez, G. Fillmann, D.A. Wunderlin, M.A. Bistoni, Multimatrix measurement of persistent organic pollutants in Mar Chiquita, a continental saline shallow lake, *Sci. Total Environ.* 490 (2014) 73–80. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.114.
- [240] X. Liu, A. Zhao, A. Zhang, H. Liu, W. Xiao, C. Wang, X. Wang, Dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in milk, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1084–1090. doi:10.1002/jssc.201000767.
- [241] N. Van Den Eede, A.C. Dirtu, N. Ali, H. Neels, A. Covaci, Multi-residue method for the determination of brominated and organophosphate flame retardants in indoor dust, *Talanta.* 89 (2012) 292–300. doi:10.1016/j.talanta.2011.12.031.