



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física**

**“DETERMINACIÓN DE POLI-ETOXILATOS DE NONILFENOL  
Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN”**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Química Inorgánica, Analítica y Química Física*

**Lic. PAOLA ALEJANDRA BABAY**

**DIRECTORES DE TESIS:** *Dr. Daniel A. Batistoni*

*Dr. Miguel. A. Blesa*

**CONSEJERO DE ESTUDIOS:** *Dra. Mabel Tudino*

**Lugar de trabajo:** *Gerencia de Química, Comisión Nacional de Energía Atómica*

**Buenos Aires, 2008**

# DETERMINACIÓN DE POLI-ETOXILATOS DE NONILFENOL Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

## **RESUMEN**

Los polietoxilatos de alquilfenol (AP $n$ EO) se cuentan entre los tensioactivos no iónicos más difundidos, y los polietoxilatos de nonilfenol (NP $n$ EO) constituyen el subgrupo mayoritario. Los AP $n$ EO presentan aplicaciones como ingredientes de detergentes domésticos, y también son componentes muy extendidos de formulaciones industriales para procesos de emulsificación, dispersión y flotación. Los derivados metabólicos de los AP $n$ EO son generados en sistemas acuáticos por degradación biológica, y frecuentemente persisten aún después del tratamiento de los efluentes. Su toxicidad supera la de los compuestos de partida y se considera que la disrupción del sistema endocrino, producida a través de mecanismos que mimetizan las funciones estrogénicas, constituye su mayor efecto adverso a largo y mediano plazo sobre poblaciones animales.

En esta tesis se propuso un enfoque de determinación múltiple, basado sobre la premisa de que un único procedimiento analítico resulta insatisfactorio para una caracterización completa de los AP $n$ EO y de sus productos de degradación biológica. Se investigaron métodos de análisis empleando técnicas instrumentales de alta discriminación como HPLC con detección UV y de fluorescencia molecular, electroforesis capilar en medio hidro-orgánico con detección UV simple y en medio no-acuoso con detección UV simple y de arreglo de diodos, y GC de alta resolución con detección de ionización de llama y por espectrometría de masas, además de protocolos de colección y conservación de las muestras, y técnicas de extracción y preconcentración por extracción en fase sólida, para asegurar la recuperación cuantitativa y selectiva de los analitos.

Se estudió en profundidad, tanto desde el punto de vista fundamental como desde el de la aplicación práctica, las técnicas de separación propuestas. Se logró desarrollar métodos de análisis robustos y se los aplicó a la investigación de procesos de degradación biológica, a la discriminación de productos comerciales y a la evaluación de muestras ambientales.

**Palabras Clave:** poli-etoxilatos de nonilfenol; bio-degradación; metabolitos persistentes; ambiente acuático; electroforesis capilar; cromatografía líquida; cromatografía gaseosa

# DETERMINATION OF NONYLPHENOL POLYETHOXYLATES AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS

## ***ABSTRACT***

Alkyphenol polyethoxylates (AP $n$ EO) are widely used non ionic surfactants, and nonylphenol polyethoxylates constitute the main sub-group. AP $n$ EO are applied as ingredients in domestic detergents, and also in industrial formulations as emulsifiers, dispersion and flotation agents. Metabolic products of AP $n$ EO are formed in aquatic systems due to biologic degradation processes, and they frequently persist even after effluent treatment. Their toxicity is higher than that of the parent compounds, and endocrine disruption through oestrogen mimicking mechanisms is considered their main long-term threat on animal populations.

The approach proposed in this thesis work is based upon the premise that a single analytical procedure is insufficient for a complete characterization of the long chain AP $n$ EO and their bio-degradation products. Employing high discrimination techniques, namely HPLC with UV and fluorimetric detection, capillary electrophoresis in hydro-organic and non-aqueous media with single wavelength and diode array UV detection, and high-resolution GC coupled to flame ionization and mass spectrometry detection, determination of the analytes was investigated. Samples collection and preservation procedures, together with solid-phase extraction and pre-concentration techniques, aimed to the quantitative and selective recovery of the compounds of interest, were also studied.

The proposed separation techniques were investigated both from a fundamental and a practical viewpoint. Robust analysis methods were developed, and they were applied in the study of biological degradation processes, the discrimination of commercial products and the evaluation of environmental samples.

***Keywords:*** nonylphenol polyethoxylates; bio-degradation; persistent metabolites; aquatic environment; capillary electrophoresis; liquid chromatography; gas chromatography

## Los siguientes trabajos surgieron durante la realización de esta Tesis:

*Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates enriched activated sludge*

M. Lozada, R.F. Itria, E.L.M. Figuerola, P.A. Babay, R.T. Gettar, L.A. de Tullio, L. Erijman

*Water Research* **38** 2077 (2004)

*Separation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol by non-aqueous capillary electrophoresis*

P.A. Babay, R.T. Gettar, M.F. Silva, B. Thiele, D.A. Batistoni

*Journal of Chromatography A* **1116** 277 (2006)

*Anaerobic nonylphenol ethoxylate degradation coupled to nitrate reduction in a modified biodegradability batch test*

L.I. Luppi, I. Hardmeier, P.A. Babay, R.F. Itria, L. Erijman

*Chemosphere* **68** 2136 (2007)

*Column temperature as an active variable in the isocratic, normal-phase high-performance liquid chromatography separation of lipophilic metabolites of nonylphenol ethoxylates*

P.A. Babay, R.T. Gettar, J.F. Magallanes, E.T. Becquart, B. Thiele, D.A. Batistoni

*Journal of Chromatography A* **1157** 227 (2007)

*Simplified determination of lipophilic metabolites of nonylphenol ethoxylates: method development and application in aqueous samples from Buenos Aires, Argentina*

P.A. Babay, E.E. Romero Ale, R.F. Itria, E.T. Becquart, B. Thiele, D.A. Batistoni

*Journal of Environmental Monitoring* **10** 443 (2008)

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Raquel T. Gettar y a Björn Thiele, las dos personas que hicieron posible que este trabajo comenzara, y de quienes nunca dejé de sentir el apoyo a pesar de la distancia física. En segundo lugar, le doy mis más sinceras gracias a Miguel A. Blesa, quien aceptó tomar la dirección de esta Tesis ante la pérdida irreparable de quien fuera mi director, Daniel A. Batistoni.

Agradezco a la Comisión Nacional de Energía Atómica por haberme permitido realizar este trabajo, y a muchos de sus integrantes, por haber podido contar con ellos cuando los necesité. Entre ellos, quiero agradecer muy especialmente a Elena T. Becquart, quien supervisó mis tareas de cromatografía gaseosa; a Jorge F. Magallanes, por su excelente predisposición “quimiométrica”; a Ezequiel Rodríguez, por haberme asistido reiteradas veces ante los desperfectos técnicos del equipo de electroforesis capilar; a Hugo Bianchi y Gabriel Molinaro, por la ayuda inconmensurable que me brindaron en un momento crítico; a Gabriela Leyva, por sus sabios consejos; a Susana Nievas, por el aguante cotidiano; y a Ricardo Lobo, por ser el compañero con quien sé que siempre puedo contar.

Los experimentos de electroforesis capilar con detección de arreglo de diodos los realicé durante una estadía en la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, en colaboración con María Fernanda Silva, a quien tengo que agradecer enormemente la forma en que me recibió.

A Raúl F. Itria y Fernando J. Mejjide, quiero agradecerles porque con ellos compartí parte de las tareas de investigación enriqueciendo enormemente esta Tesis. Y porque además fue un placer.

A Edgardo, le agradezco el amor, la paciencia y todas las cosas ricas que me cocinó en los últimos meses...

*A la memoria de mi mamá, Rosalía*

*A la memoria de Daniel Batistoni*

# INDICE

## **CAPÍTULO 1: *Introducción***

<b>1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS POLI-ETOXILATOS DE NONILFENOL</b>	<b>1</b>
<b>2. COMPORTAMIENTO AMBIENTAL</b>	<b>3</b>
2.1. BIO-DEGRADACIÓN	4
2.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS EN EL AMBIENTE	7
2.2.1. EFLUENTES TRATADOS	8
2.2.2. SISTEMAS ACUOSOS NATURALES	8
2.3. TOXICIDAD ACUÁTICA	10
2.4. DISRUPCIÓN ENDOCRINA	12
<b>3. ESCENARIO INTERNACIONAL</b>	<b>15</b>
3.1. EUROPA	15
3.2. AMÉRICA DEL NORTE Y ASIA	17
3.3. AMÉRICA LATINA, CON ESPECIAL ÉNFASIS EN LA REPÚBLICA ARGENTINA	18
<b>4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO</b>	<b>21</b>

## **CAPÍTULO 2: *Electroforesis Capilar***

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
2.1. INSTRUMENTAL	28
2.2. MATERIALES Y REACTIVOS	29
2.3. PROCEDIMIENTOS	30
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>

3.1. MEDIO HIDRO-ORGÁNICO	32
3.1.1. Cromatografía capilar electrocinética micelar	33
3.1.2. Asociación solvofóbica	36
3.1.2.a. Comportamiento electroforético de los analitos	39
3.1.2.b. Selección de las condiciones de trabajo	49
3.1.2.c. Aplicación en el seguimiento de la degradación de NP10EO en reactores SCAS	58
3.2. MEDIO NO ACUOSO	60
3.2.1. Detección espectrométrica en el ultravioleta	62
3.2.2. Efectos del solvente del electrolito soporte	63
3.2.2.a. Respuesta del flujo electroosmótico	64
3.2.2.b. Resolución de oligómeros	68
3.2.3. Comportamiento de los metabolitos lipofílicos	72
3.2.4. Influencia del solvente de la muestra sobre la selectividad	73
3.2.5. Efecto de la concentración del electrolito soporte	75
3.2.6. Discriminación de tensioactivos	77
4. CONCLUSIONES	79

---

## ***CAPÍTULO 3: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia***

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>84</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>86</b>
2.1. INSTRUMENTAL	87
2.2. MATERIALES Y REACTIVOS	87
2.3. PROCEDIMIENTOS	88
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
3.1. ELUCIÓN ISOCRÁTICA DE LOS METABOLITOS ESTROGÉNICOS	89



3.1.1.	Estudios a temperatura ambiente	89
3.1.2.	Inclusión de la temperatura de la columna como variable activa	96
3.1.2.a.	Selección de un método para el análisis cuantitativo	97
3.1.2.b.	Modelado de la retención cromatográfica de los analitos	100
3.1.2.b.i.	Diseño estadístico de experimentos	101
3.1.2.b.ii.	Desarrollo del modelo	108
3.1.2.b.iii.	Cambios en la selectividad	114
3.1.2.b.iv.	Optimización de la separación	118
3.2.	ELUCIÓN CON GRADIENTE DE LOS POLI-ETOXILATOS	122
3.2.1.	Desarrollo del método analítico	123
3.2.2.	Aplicación en un estudio de bio-degradación	125
3.3.	DETERMINACIÓN DE OCTILFENOL EN PECERAS EXPERIMENTALES	129
3.3.1.	Desarrollo de la metodología analítica	130
3.3.2.	Aplicación a las aguas de ensayo	133
3.3.3.	Efectos registrados ante la exposición crónica a OP	136
4.	CONCLUSIONES	138

---

## **CAPÍTULO 4: *Análisis de Muestras Ambientales***

---

1.	INTRODUCCIÓN	143
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	145
2.1.	INSTRUMENTAL	145
2.2.	MATERIALES Y REACTIVOS	146
2.3.	PROCEDIMIENTOS	147
2.3.1.	Generales	147
2.3.2.	Extracción en fase sólida de blancos y muestras modelo	149

2.3.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de fluorescencia	150
2.3.4. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas	151
2.3.5. Muestreo ambiental	153
2.3.6. Análisis de las muestras ambientales	155
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>157</b>
3.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE BLANCOS Y MUESTRAS MODELO	157
3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA	158
3.3. CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	160
3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES	168
3.4.1. Arroyo Morón y efluente tratado (primer muestreo)	168
3.4.2. A lo largo del tratamiento (segundo muestreo)	177
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>180</b>

---

**BIBLIOGRAFÍA**

# **CAPÍTULO 1**

## ***Introducción***

# 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS POLI-ETOXILATOS DE NONILFENOL

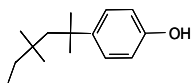
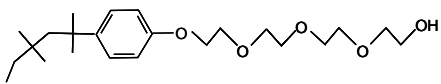
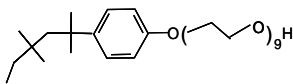
*Nonilfenol* (NP) es el término utilizado para referirse a un grupo de compuestos isoméricos de fórmula general  $C_9H_{19}-C_6H_4OH$ , cada uno consistente en una cadena alquílica de nueve carbonos unida a un anillo fenólico. Los varios isómeros pueden diferir tanto en el grado de ramificación de la cadena alquílica, como en la posición del anillo en la cual dicha cadena está unida. La mayor parte del NP que se produce comercialmente es en la forma de *4-nonilfenol* (es decir, con la cadena alquílica unida en posición *para*- al grupo fenólico, 4-NP) y con variadas ramificaciones del grupo alquílico [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001].

Entre los principales derivados del NP se encuentran los *etoxilatos de nonilfenol* (NPnEO). Los NPnEO consisten en el anillo fenólico unido por un lado a la cadena alquílica de nueve carbonos y, a través del oxígeno, a una cadena etoxilada. La etoxilación se lleva a cabo por adición de óxido de etileno a la mezcla de isómeros de nonilfenol, utilizando KOH/etanol como catalizadores. Los productos resultantes son mezclas de oligómeros con varias longitudes de cadenas etoxiladas siguiendo una distribución de Poisson [Thiele *et al.*, 1997], y generalmente se los describe por su longitud de cadena promedio.

Los NPnEO tienen la fórmula general  $C_9H_{19}-C_6H_4O(CH_2CH_2O)_nH$ , donde el número de grupos etoxilo ( $n$ ) puede variar entre 1 y 100, aunque la mayor parte de los productos comerciales contienen entre 4 y 20 de esas unidades [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001]. Los NPnEO con  $n > 4$  (llamados también *poli-etoxilatos*) poseen una naturaleza anfipática, dada por la hidrofobicidad del grupo nonilfenilo y por la hidrofiliidad de la cadena etoxilada. Es decir, los *poli-etoxilatos de nonilfenol* son tensioactivos no iónicos, y conforman el sub-grupo netamente prevaleciente de la familia de los *poli-etoxilatos de alquilfenol*, APnEO. Entre un 80 y un 90% de los APnEO existentes en el mercado son NPnEO; el resto se divide mayoritariamente entre tensioactivos *octil*- y (en mucho menor medida) *decilfenol poli-etoxilados* (OPnEO, DPnEO) [Ying *et al.*, 2002].

En la Tabla 1 se muestran las estructuras y algunas propiedades del nonilfenol y de dos de sus derivados etoxilados.

**Tabla 1.** Características y propiedades de NP, NP4EO y NP9EO [Canadian Environmental Protection Act, 2001]. La cadena alquílica representada simboliza una de las configuraciones isoméricas posibles.

<i>Propiedad</i>	<i>Compuesto</i>		
Nombre (abreviaturas)	4-Nonilfenol (4-NP, NP)	Etoxilato de nonilfenol, $n = 4$ (NP4EO)	Etoxilato de nonilfenol, $n = 9$ (NP9EO)
Estructura química			
Características físicas	Líquido incoloro a amarillento	Líquido blanco a ámbar claro	Líquido incoloro
Solubilidad en agua (mg/l)	5,4	7,7	soluble

La mayor parte de la producción de NP se utiliza para fabricar NP $n$ EO; en menor medida, el compuesto fenólico es utilizado como tal en la formulación de pesticidas, como aditivo en aceites lubricantes y como catalizador en el curado de resinas epoxi. En la forma de fosfito de tris(4-nonilfenilo), se lo emplea como antioxidante en la estabilización de gomas, polímeros de vinilo, poli-olefinas y derivados del estireno [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001; Günther *et al.*, 2002].

La gran mayoría de las aplicaciones comerciales e industriales de los NP $n$ EO hacen uso de las características dadas por sus propiedades anfifílicas. Las concentraciones micelares críticas de los tensioactivos no iónicos están entre  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  mol/l, esto es 1-2 órdenes de magnitud por debajo de las de los tensioactivos iónicos con la misma cadena hidrofóbica, debido a la ausencia de repulsión de carga entre las cabezas polares durante la formación de los agregados; además, exhiben un efecto muy pequeño en presencia de electrolitos comparado con el de los anfifilos iónicos [Thiele *et al.*, 1997].

Los NP $n$ EO son tensioactivos con una relación efectividad/costo muy favorable [Soares *et al.*, 2008], y es por ello que están presentes en numerosos productos que llegan al consumidor, incluyendo detergentes para lavandería y para vajilla, champúes, cosméticos, limpiadores domésticos, pinturas látex y espermicidas (en este último caso, en un producto conocido como

*nonoxynol-9*). Tienen además un amplio espectro de aplicaciones en la industria como tensioactivos, detergentes, agentes humectantes, dispersantes, antiespumantes, antiestáticos y limpiadores de tintas. Algunas marcas registradas de preparaciones comerciales de NP $n$ EO incluyen Igepal, Imbentin, Lissapol, Marlophen, Surfonic, Tergitol, Terric y Triton [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001]. Los principales usos industriales se dan en el procesamiento textil, en la producción de pulpa de celulosa y papel, en la fabricación de plásticos y elastómeros, en la extracción y producción de aceites, en el procesamiento de metales y de cueros, y como limpiadores industriales e institucionales [Thiele *et al.*, 1997; Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001; Canadian Environmental Protection Act, 2001; Ying *et al.*, 2002].

La producción mundial anual de AP $n$ EO ha venido creciendo de forma sostenida; por ejemplo, fue de unas 300.000 toneladas en 1990 [Thiele *et al.*, 1997], 500.000 toneladas hacia 1997 [Scott y Jones, 2000] y 7.007.000 toneladas hacia 2003 [Berryman *et al.*, 2004].

## **2. COMPORTAMIENTO AMBIENTAL**

El nonilfenol y sus etoxilatos son productos sintéticos y no se presentan en la naturaleza. Por lo tanto, las concentraciones ambientales son atribuidas completamente a actividades humanas [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001; Ying *et al.*, 2002]. Los etoxilatos ingresan al medio ambiente, principalmente, a través de la descarga de aguas de desecho industriales y municipales (ya sea tratadas o sin tratar) en cursos de agua superficiales. Las vías de ingreso al ambiente terrestre incluyen la pulverización de pesticidas que contienen NP $n$ EO en sus formulaciones, el relleno sanitario con barros de desecho y la aplicación de dichos barros en suelos para agricultura. El lixiviado de esas fuentes terrestres constituye una vía adicional de ingreso de las sustancias al ambiente acuático [Scott y Jones, 2000; Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001].

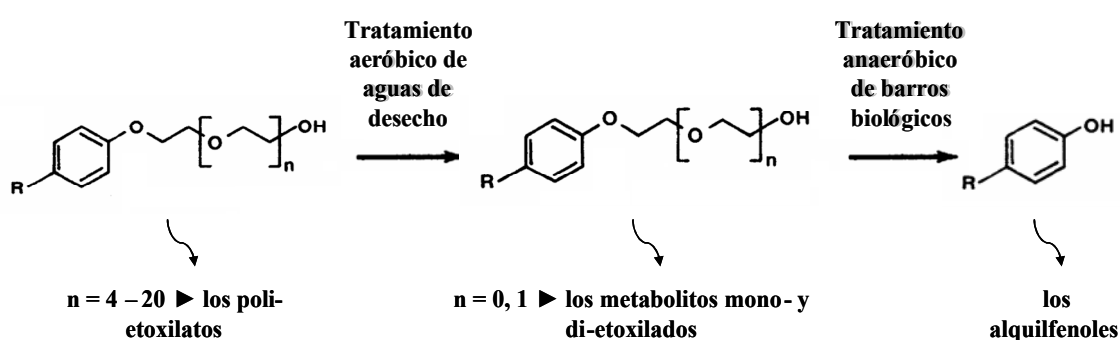
## 2.1. BIO-DEGRADACIÓN

La bio-degradación es el proceso más importante que afecta el destino final de los NP<sub>n</sub>EO en el ambiente [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001]. La bio-degradación puede definirse como la destrucción de un compuesto químico por la actividad metabólica de microorganismos. En el caso de los tensioactivos, los estudios indican que dicho proceso se daría en dos etapas bien diferenciadas. En una primera etapa de *degradación primaria*, las estructuras de las moléculas habrán cambiado lo suficiente como para perder sus propiedades anfifílicas; en una segunda etapa de *degradación final*, las moléculas se habrán convertido totalmente en CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, sales minerales y biomasa [Scott y Jones, 2000].

Si bien las formulaciones conteniendo poli-etoxilatos de nonilfenol comenzaron a emplearse hace más de 40 años [White *et al.*, 1994; Canadian Environmental Protection Act, 1999; Soares *et al.*, 2008], fue recién en la década de 1980 que se instaló la discusión sobre su comportamiento ambiental. Los etoxilatos de nonilfenol de cadena larga han demostrado sufrir, en general, una rápida degradación primaria, dada por la remoción sucesiva de grupos etoxilo, por lo que no persistirían en el ambiente; sin embargo, los compuestos intermedios, producto de la degradación primaria, podrían ser considerados *persistentes o bio-refractarios* [Scott y Jones, 2000; Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001].

En 1981, Giger y col. [Giger *et al.*, 1981] reportaron por primera vez la presencia de etoxilatos de nonilfenol con 1, 2 y 3 grupos etoxilo, y nonilfenol, en los efluentes finales de varias plantas de tratamiento mecánico-biológico en el área de Zurich, en Suiza, resultando ser los constituyentes mayoritarios en los extractos orgánicos obtenidos por destilación por arrastre con vapor. Debido a su escasa solubilidad en agua, estas sustancias no encuentran un uso extensivo en solución acuosa, y fue por ello que los autores atribuyeron su presencia en efluentes líquidos a la degradación incompleta de los poli-etoxilatos de cadena larga -componentes muy populares de todo tipo de detergentes por esos días- ya que estudios anteriores de degradación a escala de laboratorio habían dado como resultado la acumulación de NP1EO y NP2EO por acortamiento de las cadenas poli-etoxiladas. Los investigadores continuaron su tarea con la cuantificación de dichos compuestos en los efluentes líquidos [Stephanou y Giger, 1982] y, paralelamente, fue detectada por otro grupo de investigación la presencia de derivados ácidos de los poli-etoxilatos de alquilfenol, tales como los ácidos alquilfenoxi- y alquilfenoxietoxi acético, en efluentes tratados en los Estados Unidos [Reinhard y Goodman, 1982].

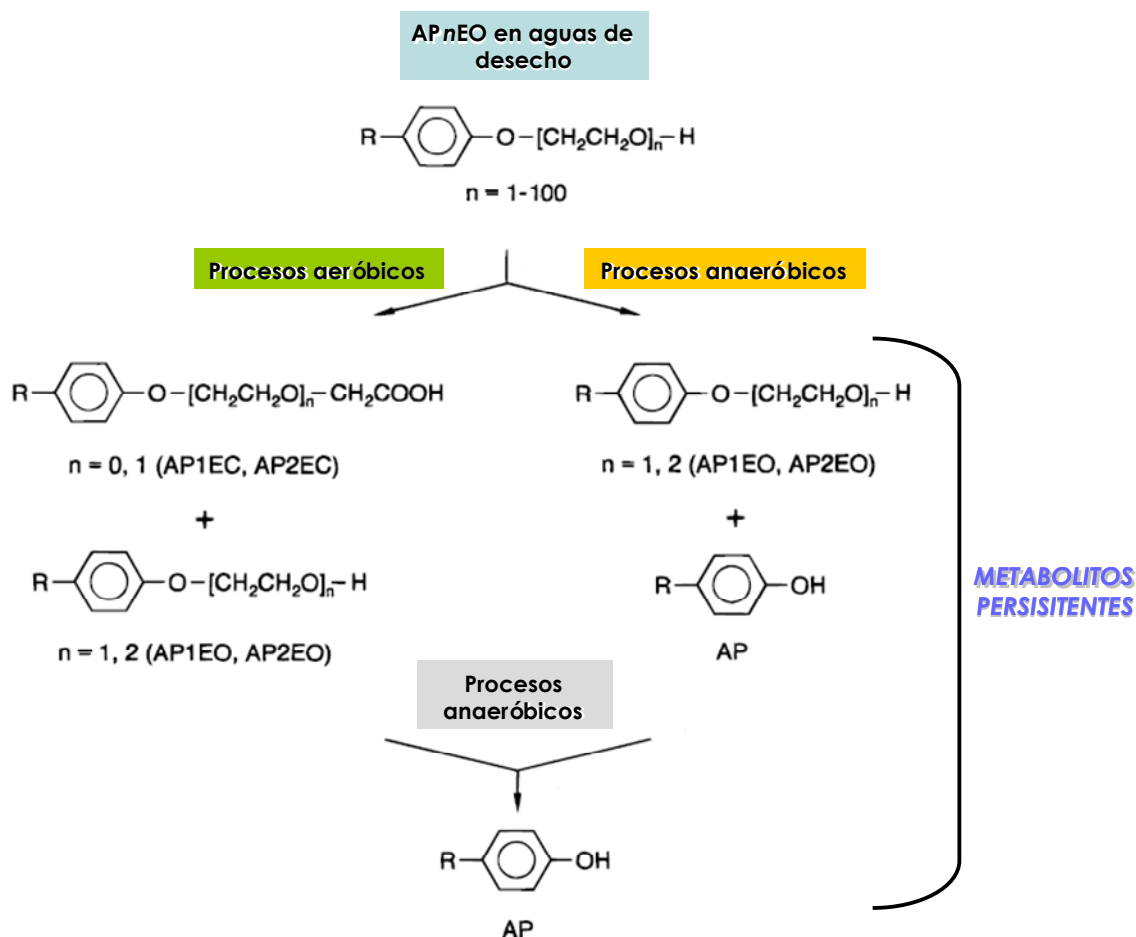
El destino de los compuestos orgánicos en una planta de tratamiento está determinado por procesos tales como el intercambio de gases con la atmósfera, la adsorción sobre sólidos suspendidos y las bio-degradaciones aeróbica y anaeróbica [Scott y Jones, 2000]. Debido a su naturaleza anfifílica, los tensioactivos presentes en el agua a tratar pueden ser adsorbidos sobre la superficie del material particulado residente, lo que resulta en una proporción significativa de la carga de tensioactivo del líquido crudo asociada a la fracción particulada. Un paso inicial típico en una planta de tratamiento es la remoción de material particulado en sedimentadores primarios, y el tratamiento de esos barros, junto con los generados en etapas posteriores del ciclo, es en general una digestión anaeróbica a temperatura elevada [Scott y Jones, 2000; Johnson y Sumpter, 2001]. En el año 1984, Giger y col. publicaron en la revista *Science* [Giger *et al.*, 1984] un trabajo en el cual atribuyeron a la bio-degradación insuficiente de los NP $n$ EO el hallazgo de cantidades extraordinariamente elevadas de 4-NP en barros estabilizados anaeróbicamente (en concentraciones entre 0,5 y 2,5 g/kg base seca, valores muy superiores a los hallados para otros compuestos orgánicos y para metales pesados de toxicidad comparable). Por otra parte, los autores encontraron que las concentraciones de 4-NP en barros activados (donde hay presentes concentraciones elevadas de oxígeno molecular), así como en aquellos estabilizados aeróbicamente, eran sustancialmente menores (en el orden de los 0,1 g/kg), a la vez que detectaron en esa clase de barros concentraciones similares de los compuestos mono- y di-etoxilados. Propusieron entonces un mecanismo general para la formación de los compuestos bio-refractarios hallados, generados a partir de la degradación primaria de los AP $n$ EO, el cual se ilustra en la siguiente figura:



**Figura 1:** Transformación biológica de los poli-etoxilatos de alquifenol durante el tratamiento de los efluentes acuosos y la digestión de los barros generados. El sustituyente R corresponde a C<sub>9</sub>H<sub>19</sub> en el caso del grupo mayoritario (nonilfenol), o a los sub-grupos minoritarios octil- y decilfenol (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> y C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, respectivamente)



Los caminos comúnmente aceptados en la actualidad para la degradación biológica de los AP<sub>n</sub>EO (derivados del mecanismo delineado inicialmente por Giger y col.), ya sea dentro de plantas de tratamiento o en procesos naturales cuando son descargados de forma directa en el ambiente, se esquematizan en la Figura 2 y se resumen a continuación.



**Figura 2:** Vías de degradación aeróbica y anaeróbica de los etoxilatos de alquilfenol. AP1EC y AP2EC representan los ácidos alquilfenoxi- y alquilfenoxietoxi acético; AP1EO y AP2EO representan los homólogos mono- y di-etoxilados; AP representa los alquilfenoles (isómeros ramificados de nonil- y octilfenol)

Si bien la velocidad y la extensión con que los diferentes procesos ocurren puede diferir en ambientes y bajo condiciones de tratamiento distintos, es en general reconocida una rápida degradación primaria de los poli-etoxilatos, la cual discurre a través del acortamiento de la cadena etoxilada. En los ambientes aeróbicos estas reacciones ocurrirían a mayor velocidad que en los anaeróbicos, originando como productos mayoritarios en el primer caso los homólogos mono- y di-

etoxilados y sus derivados ácidos y, en el segundo, los homólogos mono- y di-etoxilados junto con los completamente desetoxilados (los alquilfenoles). Todos estos productos se consideran *bio-refractarios* o *persistentes*, ya que su degradación final ocurriría a velocidades extremadamente lentas. Adsorbidos entonces sobre barros o sedimentos, donde se verían expuestos a ambientes anóxicos, la mayor parte de estos compuestos derivaría en los correspondientes alquilfenoles [Ahel *et al.*, 1994-*a*; Ahel *et al.*, 1994-*b*, Thiele *et al.*, 1997; Canadian Environmental Protection Act, 2001; Johnson *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2005; Ying, 2006].

Algunos autores han detectado también la formación de metabolitos refractarios donde tanto la cadena etoxilada como la alquílica están oxidadas, dando origen a compuestos doblemente carboxilados (carboxi alquilfenoxietoxi carboxilatos, CAPECs) [Johnson *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006; Ying, 2006], aunque la mayor parte de la información se ha centrado sobre los productos de degradación representados en la figura.

## **2.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS EN EL AMBIENTE**

La problemática ambiental asociada a los AP $n$ EO nace entonces, fundamentalmente, del hecho de que su degradación primaria da origen a compuestos persistentes, que son introducidos y acumulados en el ambiente acuático. Luego de los primeros hallazgos, citados más arriba, los metabolitos refractarios de NP $n$ EO han sido encontrados en forma ininterrumpida -constituyendo el aporte mayoritario de compuestos nonilfenólicos- en efluentes líquidos y barros de plantas de tratamiento, así como en cursos de agua superficiales y sus sedimentos asociados, en diversas regiones de Europa [Ahel *et al.*, 1994-*a*; Ahel *et al.*, 1994-*b*; Blackburn y Waldoock, 1995; Petrovic *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004], América del Norte [Ferguson *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2007] y Asia [Jin *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006; Zoller, 2006]. Algunos trabajos reportan su detección incluso en aguas subterráneas [Ahel *et al.*, 1996; Swartz *et al.*, 2006] y de lluvia [Fries y Puttmann, 2004; Peters *et al.*, 2008].

### **2.2.1. EFLUENTES TRATADOS**

Hasta hace pocos años, se estimaba que los NP<sub>n</sub>EO representaban 4-10% del total de materia orgánica que ingresaba a una planta de tratamiento [Johnson *et al.*, 2001]. La reducción de la longitud de la cadena etoxilada tiene el efecto de aumentar el carácter hidrofóbico de las moléculas, por lo que es de esperar que los metabolitos bio-refractarios se distribuyan preferentemente en las fracciones sedimentables, es decir, en los barros. Sin embargo, una porción de estos metabolitos permanece en la fase acuosa, por lo que pueden encontrarse en los efluentes concentraciones en el orden de los µg/l.

Por ejemplo, en las aguas finales de 6 plantas de tratamiento municipales en Suiza, se han reportado concentraciones entre 1 y 14 µg/l de NP, 20 y 158 µg/l de NP1EO/NP2EO, y 71 y 330 µg/l de NPEC [Thiele *et al.*, 1997]. En Canadá, sobre más de 10 plantas de tratamiento municipales muestreadas, las concentraciones halladas estuvieron entre 0,12 y 4,79 µg/l de NP, <0,02 y 43,37 µg/l de NP1EO, <0,02 y 32,62 µg/l de NP2EO, 2,15 y 74,97 µg/l de NP1EC y 2,15 y 45,40 µg/l de NP2EC [Canadian Environmental Protection Act, 2001]. Dos estudios independientes llevados a cabo en varias plantas de tratamiento en Inglaterra e Italia, mostraron que las mayores concentraciones de NP se daban en las instalaciones que recibían aguas residuales de la industria textil; en esas muestras, las concentraciones de NP resultaron de alrededor de 330 µg/l, mientras que en las plantas de tratamiento de efluentes domésticos, las concentraciones del compuesto estuvieron entre 1 y 5 µg/l. Giger y col. estimaron, sobre una base molar, el flujo másico de compuestos nonilfenólicos en 11 plantas de tratamiento suizas. Del total de compuestos nonilfenólicos hallados en el líquido crudo, el 40% fue liberado al ambiente vía efluentes secundarios y el 20% vía barros digeridos. Los efluentes secundarios consistieron de prácticamente un 50% de NPECs y un 25% de NP1EO/NP2EO, mientras que los barros digeridos anaeróbicamente contenían un 95% de NP [Thiele *et al.*, 1997].

### **2.2.2. SISTEMAS ACUOSOS NATURALES**

Las industrias y las municipalidades generan corrientes de aguas de desecho que fluyen hacia ríos, arroyos, lagos y costas marinas. Dichas aguas de desecho contienen un número muy grande de

compuestos químicos en cantidades variables. Los orígenes, el comportamiento, el tratamiento y la incidencia de *macro-contaminantes* tales como ácidos, sales, nutrientes y materia orgánica natural, los cuales se dan en concentraciones en el orden de los mg o g/l, están en la actualidad relativamente bien comprendidos. Pero es mucho más complicado evaluar el efecto que tienen sobre el ambiente acuático los miles de compuestos sintéticos y naturales que pueden estar presentes a niveles bajos (ng- $\mu$ g/l) o muy bajos (pg/l), los cuales son considerados *micro-contaminantes*. En el ambiente, los organismos (incluyendo a los humanos) están expuestos no sólo a los *micro-contaminantes* aislados, sino a sus mezclas complejas. Aunque muchas veces las concentraciones que alcanzan los contaminantes por separado son realmente bajas, los efectos aditivos o sinérgicos, tanto crónicos como agudos, pueden traer aparejado un problema ecotoxicológico considerable [Silva *et al.*, 2002; Schwarzenbach *et al.*, 2006].

Los derivados de los tensioactivos alquilfenol poli-etoxilados pertenecen a esa última clase de sustancias: son compuestos que han sido encontrados ubicuamente en aguas naturales a lo largo de los últimos 25 años, no sólo en áreas industrializadas sino también en zonas más remotas, en concentraciones que van desde las centésimas hasta las decenas (y eventualmente centenas) de  $\mu$ g/l. A modo de ejemplo, pueden citarse los estudios realizados por Giger y col. a lo largo del río Glatt, en Suiza; entre 1982 y 1997, los investigadores hallaron concentraciones que fueron de <0,3 a 45  $\mu$ g/l de NP, de <0,3 a 30  $\mu$ g/l de NP2EO, de <0,3 a 69  $\mu$ g/l de NP1EO, de 1,0 a 45  $\mu$ g/l de NP1EC y de 2,0 a 71  $\mu$ g/l de NP2EC [Thiele *et al.*, 1997]. Seis ríos muestreados en el Reino Unido mostraron concentraciones de NP entre 0,2 y 12  $\mu$ g/l, excepto en el caso de un río que recibía efluentes de la industria textil donde, nuevamente, la concentración se elevó notablemente, alcanzando niveles de 180  $\mu$ g/l [Blackburn y Waldock, 1995]. Para numerosas muestras tomadas en diversos ríos de Canadá, los niveles hallados oscilaron entre <0,02 y 4,25  $\mu$ g/l de NP, <0,02 y 2,3  $\mu$ g/l de NP1EO, <0,02 y 2,45  $\mu$ g/l de NP2EO, 0,44 y 3,17  $\mu$ g/l de NP1EC y 0,81 y 4,30  $\mu$ g/l de NP2EC [Canadian Environmental Protection Act, 2001].

En cuanto a los metabolitos ácidos, las concentraciones halladas en la fase acuosa suelen ser las más altas, debido esto a su mayor carácter polar, y a la posibilidad de encontrarse incluso en su forma iónica en las condiciones de pH muchas veces comunes en los sistemas acuosos naturales. Es interesante mencionar el caso de muestras tomadas a lo largo de 18 ríos de Taiwán [Cheng *et al.*, 2006], por tratarse de una situación notoriamente diferente a los anteriores: en ese país, menos del 10% de las aguas residuales municipales es tratado en plantas de tratamiento de efluentes y, por otra parte, los NP $n$ EO son utilizados en cantidades superiores a las 130.000 toneladas métricas/año. Los autores encontraron, para NP y NP1EO, valores de hasta 5,1 y 0,5  $\mu$ g/l, respectivamente.

Concentraciones sustancialmente mayores fueron halladas para los metabolitos mono-carboxilados (NP1EC+NP2EC+NP3EC) y di-carboxilados (CAP1EC+CAP2EC), con valores de hasta 63,6 y 94,6 µg/l, respectivamente, indicando que la bio-degradación aeróbica ocuparía un lugar importante entre las posibles rutas de transformación de los NP<sub>n</sub>EO en los ríos de Taiwán.

Debido a la baja solubilidad en agua de NP, OP, NP1EO y NP2EO, y a los altos valores de  $\log K_{ow}$ , mayores que 4 [Ying *et al.*, 2002], los sedimentos suelen encontrarse aún más contaminados que las aguas circundantes. De hecho, las concentraciones de esos analitos en los sedimentos suelen ser 1-3 órdenes de magnitud mayores que los niveles acuosos, y es por ello preocupante encontrar cantidades frecuentemente altas en la fase acuosa. El carácter fuertemente lipofílico de los productos de transformación les confiere, además, la característica de acumularse en organismos acuáticos, es decir, son compuestos *bio-acumulables*. Como regla general, los factores de bio-concentración de los compuestos orgánicos crecen con los coeficientes de partición octanol/agua crecientes y con la solubilidad en agua decreciente [Thiele *et al.*, 1997].

### 2.3. TOXICIDAD ACUÁTICA

La dificultad que encuentran los AP<sub>n</sub>EO para acceder a su degradación final, originando grados de contaminación relevantes, se ve agravada por el hecho de que los metabolitos bio-refractarios son más tóxicos que los compuestos de partida. La discusión sobre la aceptabilidad ambiental de los AP<sub>n</sub>EO surgió entonces por un lado de su persistencia y, por el otro, por la toxicidad elevada que sus productos de degradación (en especial los alquilfenoles) tienen sobre los organismos acuáticos [Giger *et al.*, 1984; Thiele *et al.*, 1997].

Aunque los estudios reportados en la literatura han empleado varias especies y diversos tipos de ensayos, existe un patrón consistente en los parámetros de toxicidad publicados para el nonilfenol y sus derivados. En general, puede decirse que se da un aumento de la toxicidad de los AP<sub>n</sub>EO a medida que disminuye la longitud de la cadena etoxilada. El NP ha demostrado tener toxicidad aguda alta en peces, invertebrados y algas, con valores de LC<sub>50</sub> (*concentración letal media*) y EC<sub>50</sub> (*concentración efectiva media*) que pueden alcanzar niveles cercanos a los 20 µg/l (por ejemplo, en el crustáceo de agua dulce *Hyalella azteca*, o en el alga marina *Skeletonema costatum*), aunque en la mayor parte de los casos se encuentran entre los 100 y 300 µg/l. Los valores de LC<sub>50</sub> y EC<sub>50</sub> para

NP $n$ EO con un promedio de 9 grupos oxi-etileno son mucho mayores que los reportados para NP tanto en peces, como en invertebrados y algas. Por ejemplo, en el caso de las especies ictícolas *fathead minnow* (“carpita cabeza”) y *trucha arco iris*, los valores de LC<sub>50</sub> reportados fueron siempre superiores a 2500 µg/l para los etoxímeros de cadena larga, mientras que para esas mismas especies se han publicado, respectivamente, valores de LC<sub>50</sub> de alrededor de 130 µg/l y 190 µg/l de NP. Con respecto a la toxicidad crónica asociada al NP, se han observado efectos para concentraciones tan bajas como 6 µg/l en peces y 3,9 µg/l en invertebrados. En cuanto a los homólogos carboxilados (NP1EC y NP2EC), se los ha encontrado en general menos tóxicos que los correspondientes homólogos etoxilados (NP1EO y NP2EO), mostrando grados de toxicidad aguda similares a los NP $n$ EO con  $n$  entre 6 y 9 [Thiele *et al.*, 1997; Canadian Environmental Protection Act, 2001].

Los alquifenoles (NP y OP), sus etoxilatos (NP $n$ EO y OP $n$ EO) y sus derivados carboxilados (NP1EC, NP2EC, OP1EC y OP2EC) suelen presentarse juntos en el ambiente acuático. Por ello, cuando se trata de determinar cuáles son los niveles aceptables de esas sustancias en aguas, sedimentos o suelos, es importante establecer niveles guía que tengan en cuenta los efectos combinados. En ese sentido, el Consejo Canadiense de Ministerios del Ambiente ha utilizado el concepto de *equivalencia de toxicidad* para caracterizar la toxicidad de la mezcla de compuestos alquifenólicos, expresando sus toxicidades individuales en términos comunes para luego sumarlas. Esta aproximación requiere que todos los componentes de la mezcla tengan un mecanismo de acción tóxica en común, y ése es el caso de nuestros compuestos de interés, los cuales para las concentraciones ambientales y los parámetros de toxicidad más típicos actúan por narcosis.

En la Tabla 2 se muestran los *factores de equivalencia de toxicidad* (TEFs) estimados para los compuestos alquifenólicos más relevantes. Esos factores fueron derivados basándose en una extensa cantidad de datos que incluían tanto estudios sobre toxicidad aguda como crónica sobre una variedad de especies de vertebrados e invertebrados acuáticos [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001]. Luego, se expresa la concentración total de sustancias alquifenólicas como *equivalentes tóxicos de nonilfenol* (TEQ), según la siguiente fórmula:

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (C_i \times TEF_i)$$

donde  $n$  es el número de compuestos alquifenólicos,  $C_i$  es la concentración del compuesto  $i$  y  $TEF_i$  es el factor de equivalencia de toxicidad del compuesto  $i$ .

**Tabla 2.** Factores de equivalencia de toxicidad para NP, NP<sub>n</sub>EO, NP<sub>n</sub>EC, OP, OP<sub>n</sub>EO y OP<sub>n</sub>EC

Compuesto	TEFs (relativos al NP)
NP	1
NP <sub>n</sub> EO (1 = n = 8)	0,5
NP <sub>n</sub> EO (n = 9)	0,005
NP1EC	0,005
NP2EC	0,005
OP	1
OP <sub>n</sub> EO (1 = n = 8)	0,5
OP <sub>n</sub> EO (n = 9)	0,005
OP1EC	0,005
OP2EC	0,005

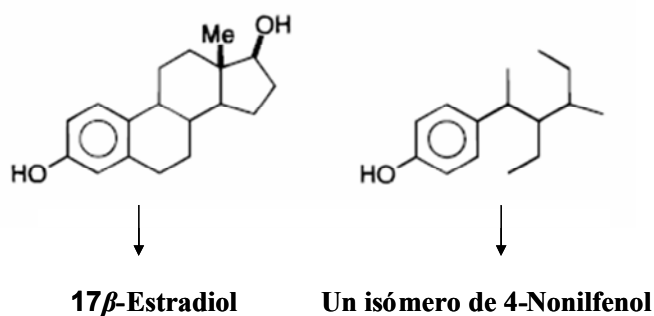
Así, al evaluar la incidencia ambiental de los compuestos asociados a los tensioactivos alquilfenol poli-etoxilados, las concentraciones deberían ser expresadas en términos de equivalentes de NP, y es la suma de todos esos equivalentes la que debería ser comparada con los niveles guía de NP establecidos para la protección de la vida acuática. En Canadá, los valores de TEQ estimados para la protección de los cursos de agua dulce y del ambiente marino son de 1,0 µg/l y 0,7 µg/l, respectivamente [Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2001].

## 2.4. DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Algunos años después de la aparición de los primeros trabajos en los que se reportaba la persistencia de los AP<sub>n</sub>EO y la toxicidad superior de sus metabolitos bio-refractarios (a principios de la década del '80), se sumó a la discusión sobre su comportamiento ambiental el descubrimiento, publicado en 1991 por Soto y col., de la actividad estrogénica del NP [Soto et al., 1991]. Además de las hormonas esteroides como el 17 β-estradiol, existen sustancias no esteroides de naturaleza química diversa que pueden mimetizar su acción estrogénica [Thiele *et al.*, 1997]. Soto y col. descubrieron que los tubos de centrifuga de plástico que utilizaban en su laboratorio liberaban una sustancia que causaba la proliferación de células tumorales estrógeno-sensitivas (en particular la línea MCF7 de cáncer de mama), e identificaron a esa sustancia como *para*-nonilfenol. El efecto

estrogénico encontrado en principio accidentalmente, fue corroborado por los investigadores en un ensayo alternativo en endometrio de rata [Soto et al., 1991].

Es interesante observar la relación estructural que los isómeros ramificados del 4-NP pueden tener con la hormona estrogénica natural, el 17  $\beta$ -estradiol; en la Figura 3 se ilustra esta relación para uno de dichos isómeros [Thiele *et al.*, 1997].



**Figura 3:** Estructuras del estrógeno natural 17  $\beta$ -estradiol y el xeno-estrógeno 4-NP (uno de los isómeros posibles).

Poco tiempo más tarde, en 1993, Jobling y Sumpter determinaron la potencia estrogénica de diferentes alquilfenoles (4-NP, 4-*ter*-OP y 2-,3- y 4-*ter*-butilfenol), de 4-NP $n$ EO con  $n = 2, 9$  y 40 y de NP1EC, empleando un ensayo *in-vitro* basado en la síntesis estrógeno-dependiente de la proteína vitelogenina en los hepatocitos de la trucha arco iris. Luego de 4 días de exposición a un nivel de concentración de  $10^{-6}$  moles/l de los distintos compuestos, encontraron que el 4-*ter*-butilfenol era el más activo, originando concentraciones de vitelogenina 100 veces por encima de la del control; muy cerca lo seguía el 4-*ter*-OP (90 veces), y luego NP2EO y NP1EC (40-50 veces). Tanto el NP como el NP9EO originaron incrementos de 18-20 veces en la síntesis de vitelogenina comparados con el control, mientras que ni el NP40EO, ni los isómeros *orto*- y *meta*- del *ter*-butilfenol mostraron efecto estrogénico alguno [Thiele *et al.*, 1997]. En un segundo estudio del mismo grupo de investigación, publicado en 1994 [White *et al.*, 1994], se examinó la potencia estrogénica de 4-NP, 4-*t*-OP, 4-NP2EO y 4-NP1EC en células de peces, aves y mamíferos. Las sustancias investigadas demostraron ser activas en todas las especies estudiadas, mimetizando los efectos del 17  $\beta$ -estradiol a través de la unión al receptor de estrógenos. El OP resultó 10-20 veces más potente que el NP, y se estableció el siguiente orden de estrogénicidad: OP > NP1EC > NP = NP2EO, independientemente del sistema ensayado.



Ensayos *in-vivo* posteriores sobre ejemplares macho de trucha arco iris, llevados a cabo por los mencionados autores con los mismos compuestos, mostraron efectivamente actividad estrogénica, manifestada tanto en la síntesis de vitelogenina (un proceso normalmente dependiente de estrógenos endógenos y, por lo tanto, característico sólo de las hembras) como en la inhibición del crecimiento testicular de los peces macho expuestos. Otros investigadores encontraron, para la misma época, que la exposición de ratas macho a 4-*ter*-OP resultaba en la reducción del tamaño testicular y de la producción diaria de espermatozoides [Thiele *et al.*, 1997]. En la actualidad, es en general reconocido que el NP y sus compuestos asociados son capaces de causar una variedad de respuestas estrogénicas en diversos organismos acuáticos. En ciertas especies de peces se han encontrado umbrales para la producción de vitelogenina cercanos a los 10 µg/l de NP [Canadian Environmental Protection Act, 2001].

La respuesta de los organismos expuestos a sustancias con capacidad de disrupción endocrina parece ser, como mínimo, aditiva [Canadian Environmental Protection Act, 2001]. Por ejemplo, un estudio reciente ha demostrado que cuando 5 compuestos estrogénicos se mezclaron en concentraciones individuales por debajo de las cuales se podían esperar efectos adversos, su efecto conjunto en peces fue deletéreo [Schwarzenbach *et al.*, 2006]. Por otra parte, los ensayos de estrogénicidad miden en general respuestas en plazos cortos y no reflejan la situación real en el ambiente, donde los organismos están expuestos de forma crónica a la descarga de compuestos estrogénicos. Desde un principio, les resultó a los investigadores inevitable pensar que la exposición crónica a pequeñas cantidades de mezclas de sustancias estrogénicas habría de producir efectos nocivos a largo plazo [Soto *et al.*, 1991; White *et al.*, 1994; Thiele *et al.*, 1997]. Hoy ya no quedan dudas acerca de que la exposición continua a través del agua puede originar efectos adversos aún para concentraciones de los xeno-estrógenos notablemente bajas; experimentos de laboratorio y de campo han demostrado de forma concluyente que cantidades pequeñas de sustancias con la capacidad intrínseca de alterar el funcionamiento del sistema endocrino, pueden interferir en el desarrollo normal de especies acuáticas si la exposición es continua [Sumpter y Johnson, 2005]. En ese sentido, la exposición de los humanos a través de los distintos componentes de la cadena alimenticia, es también un tema de preocupación [Soto *et al.*, 1991; Günther *et al.*, 2002; Thomson *et al.*, 2003; Massart *et al.*, 2005]

### 3. ESCENARIO INTERNACIONAL

#### 3.1. EUROPA

A raíz de las elevadas concentraciones de los productos de degradación de NP $n$ EO encontradas en barros de desecho, efluentes tratados y ríos de Suiza durante los primeros años de la década del '80, el uso de dichos tensioactivos en formulaciones de detergentes para lavandería fue prohibido en ese país en 1986. Inmediatamente, las compañías suizas productoras de detergentes decidieron, en forma voluntaria, ir retirando progresivamente su uso también de limpiadores para superficies de uso hogareño [Ahel *et al.*, 2000-*a*]. Muy pronto se sumaron, con acuerdos voluntarios, compañías manufactureras de detergentes de otros países de Europa [Ahel *et al.*, 2000-*b*]. En Alemania, por ejemplo, varias asociaciones industriales acordaron ese mismo año no seguir utilizando AP $n$ EO en formulaciones hogareñas y para lavandería, con un período de transición hasta 1992 [Günther *et al.*, 2001].

En un trabajo realizado sobre muestras tomadas en 1997 y 1998 en los mismos sitios que, muestreados unos 15 años antes, dieron origen a las restricciones en el uso de los NP $n$ EO en Suiza [Ahel *et al.*, 2000-*a*], los investigadores encontraron que las concentraciones de los metabolitos persistentes habían disminuido 10-50 veces, aunque todas las muestras analizadas contenían aún cantidades detectables y ambientalmente relevantes. Un estudio retrospectivo realizado por Günther y col. [Günther *et al.*, 2001] sobre moluscos del Mar del Norte colectados entre 1985 y 1995, mostró una disminución de la concentración media de NP desde 4 hasta 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para ese período, dando prueba de los resultados positivos que se estaban logrando a través del compromiso de la industria de los detergentes en Alemania. Aún así, el hecho de que los AP $n$ EO siguieran utilizándose sin restricciones como agentes dispersantes, emulsificantes y de flotación en diversas formulaciones y procesos, así como en limpiadores industriales y para automóviles [Günther *et al.*, 2002], hizo que sus productos de degradación siguieran encontrándose en el ambiente acuático en cantidades significativas [Fries y Püttmann, 2003].

En 1992, la Comisión de París y Oslo para la Protección del Ambiente Marino en el Atlántico NE hizo un llamado para que se eliminara el uso de NP $n$ EO en agentes de limpieza hogareños hacia 1995, y en formulaciones de limpieza industriales para el año 2000. Las regulaciones en varios países (como por ejemplo Suecia, Bélgica, Alemania, Gran Bretaña y Holanda) siguieron dichas

recomendaciones [Vitali *et al.*, 2004]. Sin embargo, en otros países los acuerdos voluntarios para la reducción del riesgo tuvieron sólo efectos parciales sobre la introducción de los poli-etoxilatos de alquilfenol y sus compuestos metabólicos en el ambiente [Fremmersvik y Hansen, 2004]. En España e Italia, por ejemplo, a diferencia de lo que ocurrió más al norte de Europa, los AP $n$ EO siguieron utilizándose en aplicaciones de limpieza institucionales e industriales en cantidades sustanciales [González *et al.*, 2004; Vitali *et al.*, 2004] hasta la entrada en vigencia, en 2005, de la Directiva 2003/53/EC del Parlamento Europeo por la que se impuso a los países miembros de la Unión Europea limitaciones estrictas en el uso y comercialización de los poli-etoxilatos de nonilfenol y el nonilfenol por tratarse de “sustancias peligrosas prioritarias” según la Directiva 2000/60/CE [Directiva 2003/53/CE]. El foco de la disposición está puesto en aquéllos usos que den lugar a vertidos, emisiones o pérdidas en el medio ambiente. A continuación, se transcribe en forma textual el cuadro donde se resume el alcance de la regulación vigente en Europa en este momento.

**Tabla 3.** Anexo de la directiva 2003/53/CE

<p>*46.  1) Nonilfenol <math>C_6H_4(OH)C_9H_{19}</math>  2) Etoxilatos de nonilfenol <math>(C_2H_4O)_n C_{15}H_{24}O</math></p>	<p>No se pueden poner en el mercado o usar como sustancias o constituyentes de preparados en concentraciones iguales o superiores al 0,1 % en masa para los usos siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) limpieza industrial e institucional, excepto: <ul style="list-style-type: none"> <li>— sistemas controlados y cerrados de limpieza en seco en que el líquido de limpieza se recicla o incinera,</li> <li>— sistemas de limpieza con tratamiento especial en que el líquido de limpieza se recicla o incinera;</li> </ul> </li> <li>2) limpieza doméstica;</li> <li>3) tratamiento de los textiles y del cuero, excepto: <ul style="list-style-type: none"> <li>— tratamiento sin descarga en las aguas residuales,</li> <li>— sistemas con un tratamiento especial en que el agua se somete a un tratamiento previo para eliminar completamente la fracción orgánica antes del tratamiento biológico de las aguas residuales (desengrase de pieles ovinas);</li> </ul> </li> <li>4) emulsificante en la ganadería para el lavado de pezones por inmersión;</li> <li>5) metalurgia, excepto: <ul style="list-style-type: none"> <li>— usos en sistemas controlados y cerrados en que el líquido de limpieza se recicla o incinera;</li> </ul> </li> <li>6) fabricación de pasta de papel y de papel;</li> <li>7) productos cosméticos;</li> <li>8) otros productos para el cuidado personal excepto: <ul style="list-style-type: none"> <li>— espermicidas;</li> </ul> </li> <li>9) como coadyuvantes en plaguicidas y biocidas.</li> </ol>
---	---

En este contexto, hay datos curiosos para resaltar. Por ejemplo, en Suecia (país miembro de la Unión Europea desde 1995) el consumo anual de productos que contenían NP $n$ EO comenzó a caer

de forma continua a partir del año 1993, desde unas 1500 toneladas hasta un valor negativo en 2005. Sin embargo, la masa de productos conteniendo dichas sustancias creció en ese país desde 584 toneladas en 1993, hasta alcanzar un promedio de 850 toneladas entre 1996 y 2004. En 2005, el número total de productos conteniendo NP $n$ EO sumó un total de 749 toneladas. En otras palabras, el consumo negativo observado en 2005 no significa otra cosa sino que, ese año, Suecia exportó más NP $n$ EO de lo que produjo e importó [Swedish Chemicals Agency, 2008].

### **3.2. AMÉRICA DEL NORTE Y ASIA**

En cuanto a los Estados Unidos, gran productor y consumidor de nonilfenol y sus etoxilatos -a principios de la década del '90, las dos terceras partes de la producción mundial de AP $n$ EO se originaba en ese país [Thiele *et al.*, 1997]- la situación es marcadamente diferente a la que se dio en Europa. Lejos de haber acordado ir retirando de a poco los AP $n$ EO del mercado doméstico, en Estados Unidos las compañías productoras y procesadoras de estos compuestos se han unido en 1998 para formar el *APEREC (Alkylphenols & Ethoxylates Research Council)*. Por ese medio, dichas compañías comunican los resultados de investigaciones que ellos mismos financian, además de las novedades sobre asuntos regulatorios relacionados con los AP $n$ EO. En sus sucesivos comunicados, el *APEREC* ha afirmado que niveles altos de NP y sus etoxilatos son en general síntomas de un tratamiento inadecuado, ineficiente o directamente ausente de las aguas de desecho, y sostiene que la reducción del uso debe ser una estrategia de último recurso [*APEREC*, 2008]. A pesar de que, según un relevamiento llevado a cabo sobre 139 cursos de agua de ese país entre 1999 y 2000 [Kolpin *et al.*, 2002], el NP estuvo entre los 7 contaminantes más frecuentemente detectados de una lista de 97 (y también estuvo, junto con NP1EO y NP2EO, entre aquéllos que presentaron las concentraciones más altas), la presión para mantener estos productos en el mercado estadounidense es muy fuerte, y en la actualidad no existe en ese país ninguna restricción en su uso y comercialización. Recién en diciembre de 2005, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos publicó la versión final de sus criterios para la protección de la vida acuática en relación al NP [EPA-822-R-05-005, 2005]; los valores que, según la EPA, no representarían riesgos para los organismos acuáticos son 27,75 µg/L (toxicidad aguda) y 6,59 µg/L (toxicidad crónica) en cursos de agua dulce, y 6,96 µg/L (toxicidad aguda) y 1,65 µg/L (toxicidad crónica) en sistemas salobres. Es interesante notar que esos niveles son muy superiores a los establecidos en Canadá para la

protección de la vida acuática, donde se estipularon valores de *equivalentes tóxicos de nonilfenol* de 1,0 µg/l y 0,7 µg/l para agua dulce y marina, respectivamente. Adicionalmente, también en este último país se han comenzado a implementar restricciones abocadas a la reducción del riesgo; se espera que para el año 2010, la masa total de NP y NP<sub>n</sub>EO producida e importada anualmente para aplicaciones de jabones y agentes de limpieza, así como de coadyuvantes en procesos textiles y de producción de papel y pulpa, se vea reducida en un 95% [Canadian Environmental Protection Act, 2003]. Sin embargo, nuevamente -como en el caso de Suecia- llama la atención el hecho de que dichas restricciones no se apliquen a la exportación de productos que contengan NP<sub>n</sub>EO.

Con referencia a los países de Asia, se ha notado en los últimos años en Japón un reemplazo parcial de los AP<sub>n</sub>EO por alcoholes grasos etoxilados (de forma voluntaria por parte de las industrias, ya que aún no existen regulaciones en ese sentido), además de una preocupación por parte de los gobiernos locales por monitorear las concentraciones de NP en aguas superficiales y sedimentos [Summary of the Interim Report, 2003]. En cambio, países como China, Taiwán e India producen y utilizan compuestos nonilfenólicos en grandes cantidades, y no se ha tomado hasta el momento ninguna acción tendiente a disminuir su empleo [Cheng *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008].

### **3.3. AMÉRICA LATINA, CON ESPECIAL ÉNFASIS EN LA REPÚBLICA ARGENTINA**

Finalmente, llegamos al caso de los países de Latinoamérica. Lo cierto es que la preocupación por el destino de los compuestos nonilfenólicos en el ambiente ha llegado a esta parte del mundo hace relativamente pocos años y, de más está decirlo, no existen hasta el momento regulaciones de ningún tipo con relación a su uso [Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2002; Instituto Nacional de Ecología de México, 2004; La Voz del Interior, 2005; Mundo Químico, 2006; Poder Legislativo de la Provincia de Córdoba, 2006; Soares *et al.*, 2008]. Pero esto no se debe, precisamente, a que no existan motivos para preocuparse. El hecho es que los poli-etoxilatos de nonilfenol son tensioactivos asiduamente empleados en los países de la región [Luppi, 2005]. Son numerosas las empresas que los comercializan y variados los productos en que son aplicados; los que siguen son sólo algunas figuras y datos representativos.



**WALCO S.A.**



10 Años al Servicio del Agro Colombiano

**Preservamos el Ambiente**

## PENETROL

Agente Penetrante Líquido Soluble (SL)

COMPOSICION GARANTIZADA

Nonil Fenol Etoxilado .....	250.0 gr/lit
Propilen-Glicol.....	125.0 gr/lit

**PENETROL** es un agente penetrante y humectante, elaborado a base de alcoholes y humectantes, especialmente diseñado para usarse en riego o aspersión ya que hace que el agua humedezca mejor y más rápidamente las superficies tratadas, obteniéndose una mejor dispersión, cobertura y penetración de los fertilizantes, fungicidas, herbicidas e insecticidas agrícolas, además ayuda en la compatibilidad de diferentes combinaciones de productos agroquímicos.

Con **PENETROL**, los agroquímicos llegan mejor a los sitios de absorción en pocos minutos, protegiéndose así de las pérdidas por agua lluvia.



WALCO S.A. PRODUCTOS AGRICOLAS SOLUCION PARA LOS CULTIVOS ROSAS WALCO S.A.

**Figura 4:** Nonilfenol etoxilado como coadyuvante para agroquímicos, Colombia.

ID	Producto	Consumo	Pais del cliente	Estado	Puesto	Observaciones
10675	nonilfenoles etoxilados	50 TM Anual		DISTRITO FEDERAL	DIRECTOR COMERCIAL	<a href="#">más</a>
37375	nonilfenoles etoxilados	400 TM Anual		Aragua	Gerente	<a href="#">más</a>
2500	nonilfenol	1 TM Anual				<a href="#">más</a>
8143	nonilfenol etoxilado 6 M	20 TM Anual		Pichincha	JEFE CONTROL DE CALIDAD	Favor enviar hoja técnica y hoja de seguridad del producto <a href="#">más</a>
8935	nonilfenol etoxilado	1000 L Anual		México	Producción	<a href="#">más</a>
9324	nonilfenol etoxilado 10 moles	120 TM Anual		ARAGUA	GERENTE GENERAL	<a href="#">más</a>
10927	nonilfenol 9	250000 TM Anual			Marketing Analyst	<a href="#">más</a>
35274	nonilfenol etoxilado	240 TM Anual		capital federal	OPERADOR COMERCIAL	<a href="#">más</a>

**Figura 5:** Solicitud de productos relacionados con nonilfenol etoxilados en el portal de la industria *QuimiNet.com*. Se seleccionaron los pedidos publicados por clientes de México, y el último renglón corresponde a la solicitud de un cliente de Buenos Aires.

PRODUCTOS

Listado PDF download

A	B	C	D	E	F	G	H	I
J	K	L	M	N	O	P	Q	R
S	T	U	V	W	X	Y	Z	A-Z

- N,N-DIMETILETANOLAMINA
- NAPROXENO
- NAPROXENO SODICO
- NCENDX® B-1000
- NCENDX®P-30
- NEOPENILGLICOL
- NONIL FENOL 15M
- NONIL FENOL 30M
- NONIL FENOL 4M
- NONIL FENOL 9.5M
- NONIL FENOL ETOXILADOS
- NONIL FENOL ETOXILADO 10 Moles de Oxid
- NONIL FENOL ETOXILADO 6M



Nuestras soluciones logísticas incluyen embarques a granel, isotanques, contenedores y cargas en camión optimizando recursos para brindar la mejor alternativa.



Nombre: NONIL FENOL ETOXILADO 6M

CAS Number: 9016-45-9

Aplicación/Usos: \* Co-emulsificante en ceras líquidas; \* Emulsificador para ceras de polietileno; \* Emulsiones concentradas de agroquímicos y concentrados emulsificables; \* Desgrasante \* Co- surfactante de limpieza a seco y lavavajillas mecánico; \* Mejorador de enjuague y co-surfactante para preparaciones limpiantes de fibras sintéticas; \* Agente fijador para enjuagues de aceites; \* Lavador auxiliar en el procesamiento del cuero; \* Agente emulsificante y nivelante para colorantes; \* Emulsificante para aceites de cortes; \* Agente humectante y dispersante para pigmento

Disponibilidad: Local

Av Belgrano 1683 9º - C1093AAE Buenos Aires Argentina tel: 54 11 5218-1300 fax: 54 11 4383-6774

Figura 6: Oferta de NP<sub>n</sub>EO de la empresa Arubras, Argentina.

**LAVAVAJILLA** aroma **Limón**

**750 CONT. NETO CM<sup>3</sup> INDUSTRIA ARGENTINA**  
Limpiador Lavavajilla  
Biodegradabilidad Min. 80%  
Fecha de Vencimiento: 2 años a partir de elab.

**Modo de Uso:** Diluir 2 cucharadas en 6 litros de agua.

**Contiene:** Agua, Dodecil benceno sulfonato de trietanolamina, Laurileter sulfato de sodio, Coco amido propil betaina, Nonil fenol etoxilado 10 moles, Cloruro de sodio, Sulfato de magnesio, Fragancia, Colorante, Conservante.

**PRECAUCIONES:** Mantener fuera del alcance de los niños. En contacto con los ojos lavar con abundante agua. En caso de ingestión accidental beber agua. No inducir el vómito. No volver a utilizar los envases vacíos. **Atención! NO MEZCLAR CON LAVANDINA. Es peligroso para la salud.** No ingerir. En caso de ingestión consulte a su médico o llame al Htal. de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez: (011)4962-6666; Policlínico Prof. A. Posadas: (011)4654-6648/4658-7777; Centro Nacional de Intoxicaciones (llamada gratuita): 0800-333-0160; Htal de Niños de La Plata: (0221)451-5555

R.N.E.: 020085556 PAMS 22.685  
RIN: 201.717/1 RNPUD: 0250002

Haborador TIMUKA S.A.C.I.C.I.y F. - Zapiola 3741 - (1754) San Justo - Pcia. de BUENOS AIRES Tel.: 4484-3418/4651-0121/2

7 9 1 8 8 6 0 0 0 3 6 1

Figura 7: NP<sub>10</sub>EO en un lavavajillas doméstico producido por TIMUKA SACICIF, Argentina. La misma empresa fabrica el lavavajillas Héroe, que también contiene NP<sub>10</sub>EO.

Como consecuencia del uso extendido (e irrestricto) de estos tensioactivos en los países de la región, es de esperar una contaminación importante de los ambientes acuático y terrestre. Sin embargo, hasta la fecha, fue posible encontrar sólo contadas publicaciones científicas (menos de 5, a través de una búsqueda en *Scopus*) en las que se haga referencia a la presencia de dichas sustancias en compartimentos ambientales de los países de América Latina. En general, puede decirse que existe en la región una carencia casi absoluta de evaluaciones de los niveles de concentración reales de los compuestos de origen y sus metabolitos, así como de sus procesos de degradación en los sistemas de tratamiento y ecosistemas propios de cada zona, y sus efectos sobre los habitantes de dichos ecosistemas [Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2002; Instituto Nacional de Ecología de México, 2004]. En la Argentina, la incidencia de los NP $n$ EO y sus productos de degradación como parte de la contaminación orgánica de aguas y sistemas asociados es virtualmente desconocida.

#### **4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO**

El principal objetivo de esta Tesis ha sido investigar e instrumentar métodos separativos destinados a caracterizar cualitativa- y cuantitativamente los tensioactivos no ionicos NP $n$ EO y sus derivados metabólicos. El propósito final fue el de constituir una base sólida sobre la cual poder realizar una evaluación rigurosa de la distribución y la incidencia de dichos xenobióticos en el ambiente acuático de nuestro país.

La comprensión de los mecanismos de degradación de los compuestos nonilfenólicos es un factor crucial a la hora de predecir su destino en el ambiente. Los resultados de distintos experimentos a escala de laboratorio y de campo indican que el origen de los microorganismos responsables de la degradación, junto con otras numerosas variables locales involucradas, ejercen una influencia importante sobre el destino final de los compuestos nonilfenólicos. Por otro lado, la optimización de los métodos de tratamiento existentes, orientada hacia la mineralización de los *micro-contaminantes*, puede ser crítica si se desea evitar los altos costos de capital y de operación en general asociados con los tratamientos avanzados de los efluentes finales (como por ejemplo la adición de filtros de carbón activado o la ozonización), los cuales por otra parte no resuelven un problema fundamental que es la acumulación de barros contaminados [Schwarzenbach *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008]. En este contexto, la disponibilidad de herramientas analíticas sensibles y



robustas constituye un punto clave, y es por ello que una parte sustancial del presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo la participación en estudios interdisciplinarios orientados hacia la elucidación de los aspectos microbiológicos y ambientales involucrados en la bio-degradación de los NP $n$ EO.

Ante la complejidad de las mezclas de los analitos, uno de los objetivos particulares de este trabajo ha sido el de desarrollar métodos simples y económicamente viables que permitieran una caracterización completa de los NP $n$ EO y de sus productos de degradación biológica. Se propuso para ello un enfoque analítico múltiple, basado en el estudio profundo de diferentes técnicas complementarias, aptas para análisis bidimensional. Se investigaron y aplicaron metodologías de preparación de muestras y de determinación de alta discriminación, tales como extracción en fase sólida, electroforesis capilar en medios acuoso y no acuoso con detección por absorción molecular UV, cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por absorción molecular UV y fluorescencia molecular, y cromatografía gaseosa empleando como detectores ionización de llama y espectrometría de masas.

## **CAPÍTULO 2**

### ***Electroforesis Capilar***

# 1. INTRODUCCIÓN

Las separaciones por electroforesis capilar (EC) se basan en la migración diferencial de los analitos a lo largo de un tubo capilar de sílice fundida lleno con un electrolito soporte (*background electrolyte*, BGE). La migración tiene lugar bajo los efectos combinados de los flujos electroforético y electro-osmótico (*electro-osmotic flow*, EOF), generados por la aplicación de un campo eléctrico a través del capilar.

Cuando una partícula cargada es sometida a la acción de un campo eléctrico ( $E$ ), alcanza una velocidad de estado estacionario ( $v_{ee}$ ) que está relacionada con su carga ( $q$ ) y con sus propiedades friccionales:

$$v_{ee} = q E / f \quad \text{Ec. (1)}$$

donde  $f$  es el coeficiente de fricción traslacional de la partícula. La movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) se define como la velocidad de estado estacionario por unidad de campo eléctrico:

$$\mu_{ep} = q / f \quad \text{Ec. (2)}$$

Las diferencias en las movilidades electroforéticas surgen entonces de diferencias en la carga neta de las partículas y en sus propiedades friccionales (tamaño y forma).

Cuando el analito puede ser modelado como una esfera sólida, la relación entre el coeficiente de fricción traslacional y el tamaño molecular está dada por la ley de Stokes:

$$f = 6\pi\eta R \quad \text{Ec. (3)}$$

donde  $R$  es el radio hidrodinámico aparente de la partícula y  $\eta$  es la viscosidad del medio circundante. Para una esfera sólida el radio está relacionado con la masa ( $m$ ) a través de la siguiente ecuación:

$$m = \rho_p (4/3 \pi R^3) \quad \text{Ec. (4)}$$

donde  $\rho_p$  es la densidad de la partícula. Así, resulta:  $R \sim m^{1/3}$  y  $f \sim m^{1/3}$ .

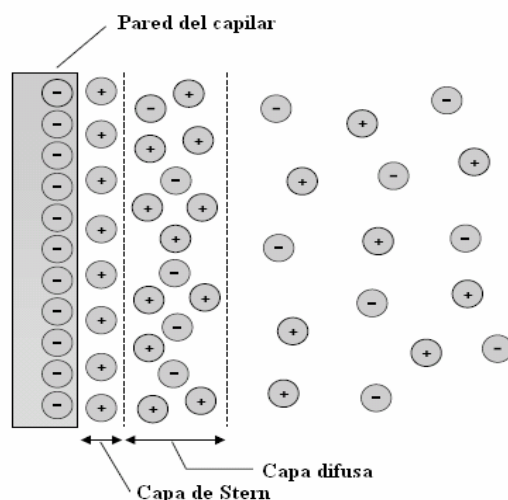
La forma en que la movilidad electroforética en solución libre se relaciona con el tamaño molecular depende fuertemente de la conformación del soluto. Cuando en lugar de comportarse como una esfera sólida, el soluto puede ser representado por ejemplo por un espiral (como es el caso de una molécula de ADN), el coeficiente  $f$  tendrá una proporcionalidad directa con la masa molecular ( $f \sim m^{1.0}$ ) [Grossman y Colburn (Eds.), 1992; Heiger, 1992; Foret *et al.*, 1993].

Por otra parte, cuando una sustancia está presente en diferentes formas en equilibrio dinámico (por ejemplo, las especies protonadas y desprotonadas en un equilibrio ácido-base) y siempre que la interconversión sea lo suficientemente rápida, la movilidad electroforética del analito es una combinación de las movilidades de las  $i$  especies en equilibrio, ponderadas por la fracción molar de cada especie ( $\alpha_i$ ):

$$\mu_{ep} = \sum \alpha_i \mu_i \quad \text{Ec. (5)}$$

El balance entre las diferencias en estas propiedades constituye entonces la base de la separación en electroforesis capilar.

La electro-osmosis es el flujo neto de líquido debido al efecto del campo eléctrico sobre los contraiones adyacentes a la superficie interna del capilar. En soluciones acuosas de  $\text{pH} > 2$ , los grupos silanol de la pared del capilar de sílice fundida se encuentran en gran proporción disociados. Así, la superficie posee una carga neta negativa que es contrarrestada por una acumulación de contraiones positivos en la región adyacente, los cuales forman una doble-capa eléctrica (una capa fija o *de Stern* + una difusa); en la Figura 1 se esquematiza esta situación.

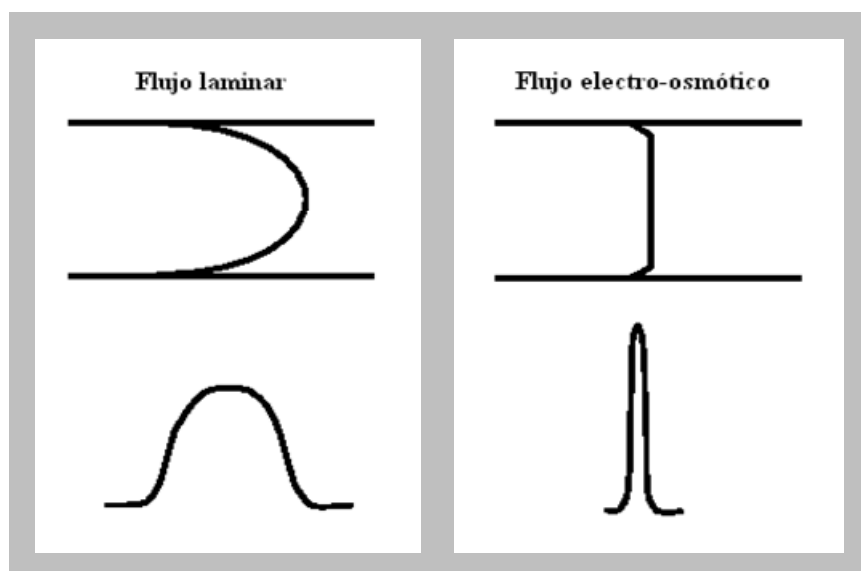


**Figura 1:** Modelo de Stern de la distribución de carga en la doble capa sobre la pared del capilar cargada negativamente.

Ante la aplicación del campo eléctrico, la capa difusa de iones cargados positivamente es atraída hacia el cátodo. Como dichos cationes están solvatados su movimiento arrastra consigo solución, dando origen al flujo electro-osmótico.

En esta técnica, la electroforesis se desarrolla en capilares de diámetros internos típicamente entre 25 y 75 micrones; el uso de tubos de diámetros tan reducidos tiene numerosas ventajas y le confiere a la EC características únicas.

Por un lado, da origen a una velocidad del EOF independiente del radio, o sea, a un perfil del flujo electro-osmótico plano. Esta es una característica fundamental que diferencia a la electroforesis capilar de los sistemas conducidos por presión (donde el flujo es parabólico) y hace posible la obtención de picos muy angostos, tal como se representa en la siguiente figura:



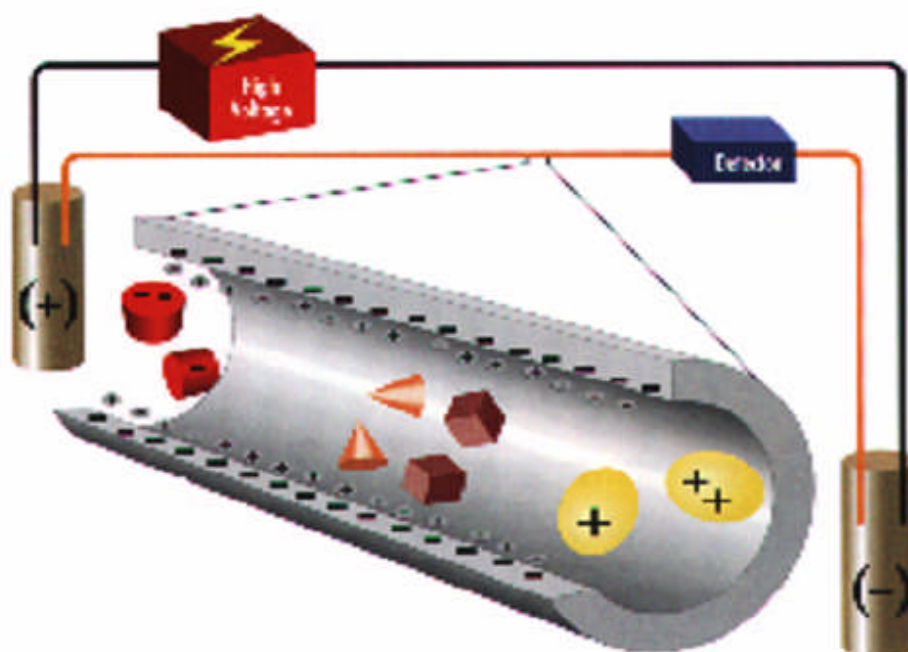
**Figura 2:** Esquemización de los perfiles de flujos laminar y electro-osmótico.

Por otra parte, el diámetro reducido del capilar también es muy beneficioso con respecto a los efectos deletéreos del calentamiento de Joule. La resistencia eléctrica alta de los capilares permite la aplicación de campos eléctricos muy elevados (100-1000 V/cm) con una generación de calor mínima. Además, la relación área/volumen del capilar también es alta, lo que permite una eficiente disipación del calor generado y la posibilidad de utilizar campos eléctricos elevados.

Si se suman estas dos características, el resultado es una técnica con alta eficiencia y gran capacidad resolutiva (picos estrechos y tiempos de análisis cortos). El formato capilar trae aparejado, además, un bajo consumo de reactivos (en el orden de  $\mu\text{l}$ ) y de muestra (en el orden de  $\mu\text{l}$ ), con una consecuentemente baja generación de residuos.

Los diferentes modos de EC se diferencian fundamentalmente por la composición del electrolito soporte, seleccionada de acuerdo al tipo de compuestos que se desea separar. Es decir, para variar la selectividad y ampliar del ámbito de aplicaciones, no es necesario cambiar el tipo de capilar.

La forma más directa de aplicación de la técnica es la *electroforesis capilar de zona* (CZE). En CZE la separación se basa en la diferencia de movilidades electroforéticas de analitos iónicos o fácilmente ionizables, y se lleva a cabo en soluciones salinas simples, de pH regulado (por ejemplo, buffer fosfato o borato). En la Figura 3 se representa la separación de aniones y cationes por CZE; en este caso, los compuestos neutros son dirigidos hacia el cátodo por la fuerza impulsora del EOF.



**Figura 3:** Esquema del arreglo instrumental (capilar, electrodos, fuente de potencial, detector). Se muestra en tamaño aumentado un corte del capilar de sílice fundida con sus paredes cargadas negativamente, donde ocurre la separación de aniones y cationes por CZE y los compuestos neutros son dirigidos hacia el cátodo por la fuerza impulsora del EOF.

La electroforesis capilar se ha constituido en una técnica de referencia en las áreas bioquímica y farmacéutica desde hace ya varios años [Altria *et al.*, 2001] y, en los últimos tiempos, ha crecido notablemente el interés en sus aplicaciones en el área ambiental [Menzinger *et al.*, 2000; Richardson, 2003]. Un documento publicado por la EPA [USEPA, 1999] describe muy bien esta situación; los puntos más importantes se transcriben, en forma resumida, a continuación.

EPA, Julio 1999 – “Capillary Electrophoresis for Environmental Monitoring”:

*“...The Analytical Chemistry Research Program of the National Exposure Research Laboratory’s Environmental Sciences Division (ESD ) is developing new methods for determining toxic and hazardous chemicals in samples from hazardous waste sites. This research is guided by several goals for analytical methods... These goals are summed up by the phrase “cheaper, better, and faster,” and are being met by an innovative separations technology called capillary electrophoresis (CE) that is new to environmental analysis... CE is a separations technique that can meet the goals stated above while filling a central, cross-cutting role in analytical chemistry for polar volatiles, most semivolatiles, nonvolatiles (e.g., herbicides), inorganic cations, inorganic anions, and biomarkers (i.e., indicators of exposure). Introduced in 1981, CE is now firmly established as the technique of choice for pharmaceutical and biomedical analysis... CE methods that are applicable to routine problems are emerging, and EPA-approved CE methods are anticipated shortly. CE technology is widely developed commercially and EPA staff at ESD is confident that current CE methods are sufficiently robust to provide valuable contributions to environmental assessment at the present time...”*

En general, los grupos de contaminantes que hasta la fecha han recibido mayor atención son los fenoles [Morales y Cela, 1999; Morales y Cela, 2000; Blanco *et al.*, 2005] y los agroquímicos [Carabias-Martínez *et al.*, 2000; Menzinger *et al.*, 2000; Quesada-Molina *et al.*, 2007]. En el año 2000, Martínez y col. [Martínez *et al.*, 2000] publicaron un trabajo de recopilación sobre el acoplamiento de la extracción en fase sólida y la EC aplicado al análisis de muestras ambientales. Este acoplamiento demostró ofrecer una alternativa efectiva a la hora de determinar trazas de contaminantes orgánicos en compartimentos ambientales tales como aguas superficiales, subterráneas, de desecho y de bebida, así como en suelos e incluso en vegetales.

El desafío planteado en esta parte del trabajo de tesis fue el de determinar moléculas no-iónicas (los *poli-etoxilatos de nonilfenol*, los cuales poseen además propiedades anfifílicas) y sus productos de degradación (los *etoxilatos de nonilfenol de cadena corta*, también no-iónicos, así como el derivado fenólico *nonilfenol*, todos ellos fuertemente lipofílicos, y el ácido débil *ácido monoetoxiacético*), utilizando una técnica que, por su naturaleza, requiere que los analitos estén cargados. Se exploró para ello las separaciones en medio hidro-orgánico (ACE, *aqueous CE*) y en medio completamente no-acuoso (NACE, *non-aqueous CE*). Los medios no-acuosos y los hidro-orgánicos, además de resultar útiles para la separación de compuestos insolubles en agua, posibilitan la utilización de

formas alternativas (diferentes a las que se dan en soluciones puramente acuosas) de conferir carga a los solutos [Walbroehl y Jorgenson, 1986].

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. INSTRUMENTAL**

Equipo de electroforesis capilar *SpectraPHORESIS* (ThermoSeparation Products, CA, Estados Unidos), que consiste de un módulo de separación *ULTRA*, un sistema de refrigeración del capilar por aire, un detector UV/Visible de barrido secuencial *UV3000*, un muestreador automático termostatzado *VIAL SERVER*, una interfaz *SN4000* y un software para control instrumental, adquisición y procesamiento de datos *PC1000*.

Equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Instruments, CA, Estados Unidos), equipado con un módulo de separación, un sistema de refrigeración del capilar por líquido, un detector UV/Visible de arreglo de diodos, un muestreador automático termostatzado y un software para control instrumental, adquisición y procesamiento de datos P/ACE System MDQ.

Capilares de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (Alltech, Estados Unidos y MicroSolv Technology Corporation, Estados Unidos). Dimensiones: 39,3 cm de longitud total y 33,5 cm de longitud hasta la ventana de detección para el equipo ThermoSeparation; 57,0 cm de longitud total y 50,0 cm de longitud hasta la ventana de detección para el equipo Beckman.

Espectrofotómetro UV/Visible con arreglo de diodos HP-8453 (Hewlett-Packard, CA, Estados Unidos).



## 2.2. MATERIALES Y REACTIVOS

Nonilfenol grado técnico (t-NP), composición nominal: 85% 4-nonilfenol (Fluka, Buchs, Suiza)

Monoetoxilato de nonilfenol (4-NP1EO, Promochem, Wesel, Alemania)

Dietoxilato de nonilfenol (4-NP2EO, Promochem, Wesel, Alemania)

Acido monoetoxi acético (NP1EC, Promochem, Wesel, Alemania)

NP $n$ EO con promedios de 4 y 10 unidades de óxido de etileno (Proquimia SA, Chile)

NP $n$ EO con un promedio de 7,5 unidades de óxido de etileno (PONPE 7.5, Tokyo Kasei Ind., Japón)

2,4,6-trimetilfenol (TMP, Fluka, Buchs, Suiza)

Acido 4-bromofenil acético (BPA, Fluka, Buchs, Suiza)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, p.a. (Carlo Erba, Milan, Italia)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, p.a. (Carlo Erba, Milan, Italia)

Dodecil sulfato de sodio (SDS), p.a. (Carlo Erba, Milan, Italia)

NaAc · 3H<sub>2</sub>O, calidad SigmaUltra (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos)

HAc (glaciar), grado electrónico (J. T. Baker, Estados Unidos)

Solventes orgánicos, grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania o calidad similar)

Agua *nanopure*, resistividad 18 MΩ cm, obtenida con una unidad de purificación de agua Simplicity (Millipore, SP, Brasil)

Filtros de membrana para jeringa, de Nylon o PVDF, 0,45 μm (Millipore o National Scientific, Estados Unidos)

### 2.3. PROCEDIMIENTOS

Las soluciones estándar de los analitos se prepararon a diario por dilución de soluciones madre conservadas a 4 °C. Las soluciones madre fueron: NP, NP1EO y NP2EO 1 g/l en acetonitrilo o metanol, y NP10EO y PONPE 7.5 10 g/l en acetonitrilo, metanol o agua.

La identificación de los picos electroforéticos para compuestos con menos de 3 grupos etoxilo se realizó de forma directa por adición de soluciones estándar de t-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO. Para la identificación de componentes con  $n > 3$ , la identificación se realizó de diferentes formas en medios hidro-orgánico y no acuoso. En medio hidro-orgánico, la asignación de picos se realizó basándose en su secuencia de migración a partir de los tiempos de migración de los compuestos con menos de 3 grupos etoxilo. En medio no acuoso, se adicionaron los oligómeros individuales obtenidos por separación cromatográfica, tal como se describe a continuación. Una muestra de NP4EO, consistente en una mezcla de oligómeros con  $n$  entre 1 y 10 unidades etoxilo, fue sujeta a separación por HPLC con el objeto de aislar los homólogos etoxilados con  $n = 4$  a 7, requeridos como estándares secundarios para electroforesis capilar; el material de partida fue una solución de concentración 1,2 g/l de NP4EO en ciclohexano/2-propanol (90 + 10). El equipamiento y la columna utilizados se describen en la sección experimental del capítulo “*cromatografía líquida de alta eficiencia*”. La elución de los compuestos individuales se llevó a cabo con un gradiente binario entre A: hexanos (95% *n*-hexano/5% hexanos ramificados) y B: 2-propanol. El programa seguido, a una temperatura de 50 °C, fue: 10 minutos isocráticos con 96% A - 4% B y luego un gradiente lineal hasta 50% A - 50% B en 32 minutos, con un caudal de trabajo de 1,0 ml/min. Las fracciones se colectaron por medio de una válvula manual de 3 vías (Rheodyne 7030RV, USA) a partir de inyecciones de 50  $\mu$ l de la solución concentrada de NP4EO. El solvente fue luego evaporado a sequedad con corriente de N<sub>2</sub>, y los residuos redisoluertos en acetonitrilo para la inyección en electroforesis capilar.

Las soluciones de electrolito soporte (BGE) fueron preparadas diariamente disolviendo las masas pesadas de las sales en los solventes o mezclas de solventes correspondientes. En los experimentos con mezclas hidro-orgánicas, el pH que se indica es el del buffer fosfato acuoso antes de su mezcla con el solvente orgánico. En los experimentos en medio no acuoso, con excepción de la composición de solventes ACN/MeOH 80+20 (en volumen), se agregó siempre ácido acético

glacial en una concentración final de 2% (v/v), para permitir la disolución completa de la sal (NaAc.3H<sub>2</sub>O) en el medio orgánico.

Al comienzo de la jornada de trabajo, y al cambiar la composición del BGE o las variables instrumentales, se lavó los capilares con agua (1 minuto), NaOH 0,1 M (1 minuto), agua (1 minuto), el solvente del BGE (1 minuto) y finalmente el electrolito de corrida (2 min). Luego el capilar fue acondicionado por aplicación del potencial de corrida hasta alcanzar estabilidad en la corriente y en la línea de base (20-30 minutos). Antes de cada corrida se realizó un paso de lavado del capilar con el BGE por 2 minutos, y al final de cada corrida se agregó 1 minuto de lavado con el solvente correspondiente.

Todas las soluciones de muestra y BGE fueron filtradas a través de membranas de PVDF o Nylon de 0,45 µm antes de su ingreso al capilar.

Se utilizó acetona (1% v/v) como marcador del flujo electroosmótico, excepto en ciertos casos donde el solvente de la muestra daba un pico de absorción en el UV que fue utilizado con los mismos fines.

Las movilidades electroosmóticas ( $\mu_{eo}$ ) fueron calculadas de la siguiente manera:

$$\mu_{eo} = L l / t_{eof} V \quad \text{Ec. (6)}$$

donde  $t_{eof}$  es el tiempo de aparición del marcador neutro (en s),  $V$  es el potencial de separación (en V),  $L$  es la longitud total del capilar y  $l$  es la longitud del capilar hasta la ventana de detección (en cm).

Las movilidades electroforéticas ( $\mu_{ep}$ ) se calcularon como:

$$\mu_{ep} = (L l / t_m V) - \mu_{eo} \quad \text{Ec. (7)}$$

donde  $t_m$  es el tiempo de migración del analito (en s),  $V$  es el potencial de separación (en V),  $L$  es la longitud total del capilar y  $l$  es la longitud del capilar hasta la ventana de detección (en cm).

Los experimentos en medio hidro-orgánico fueron llevados a cabo en su totalidad con el equipo ThermoSeparation. Los viales con muestras y BGE se mantuvieron siempre a temperatura

ambiente, mientras que la temperatura del capilar fue variada de acuerdo a los experimentos, al igual que el potencial de corrida y el tiempo de inyección de muestra.

Los experimentos en medio no acuoso fueron realizados en parte con el equipo ThermoSeparation y en parte con el Beckman. En ambos casos, el capilar, las muestras y el BGE fueron mantenidos a 15 °C para evitar evaporación significativa y ebullición local o formación de burbujas con los solventes altamente volátiles investigados. El potencial de corrida se mantuvo en 15 kV y la introducción de la muestra se llevó a cabo en modo hidrodinámico en el extremo anódico del capilar, aplicando 0,8 psi durante 2,5 segundos en el equipo ThermoSeparation y 0,5 psi durante 5,0 segundos en el equipo Beckman.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. MEDIO HIDRO-ORGÁNICO**

La electroforesis capilar tiene el potencial de separar diferentes clases de compuestos en una única corrida, lo que la hace muy atractiva para el análisis de muestras complejas [Regan *et al.*, 2003]. Por eso, la idea en esta parte del trabajo era poder determinar en forma conjunta todos los compuestos que podrían presentarse en muestras de nuestro interés. Estos compuestos son los polietoxilatos de nonilfenol y sus productos de degradación más importantes, los etoxilatos de nonilfenol de cadena corta, el nonilfenol y el ácido nonilfenoxi acético. Se incorporaron también 2,4,6-trimetilfenol (TMP) y ácido 4-bromofenil acético (BPA) para ser evaluados como estándares internos. El TMP se presenta en la literatura como estándar interno en la determinación de NP, NP1EO y NP2EO por HPLC [Ahel *et al.*, 2000-*a*], y el BPA se incluyó como potencial estándar interno para el NP1EC.

Si bien el nonilfenol ( $pK_a = 10,7$ ) [Canadian Environmental Protection Act, 2001] podría cargarse negativamente en proporción apreciable para pH's mayores que 11, y el ácido nonilfenoxi acético ( $pK_a 3-5$ ) estaría cargado negativamente casi por completo para pH's mayores que 5, lo que los

haría en principio plausibles de ser determinados por CZE [Regan *et al.*, 2003], era necesario buscar una estrategia de separación que permitiera determinar en forma selectiva también a los etoxilatos. Para poder determinar simultáneamente a estos tres tipos de compuestos había que adaptarse, entonces, a los modos de EC que permiten separar compuestos neutros.

### 3.1.1. CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR

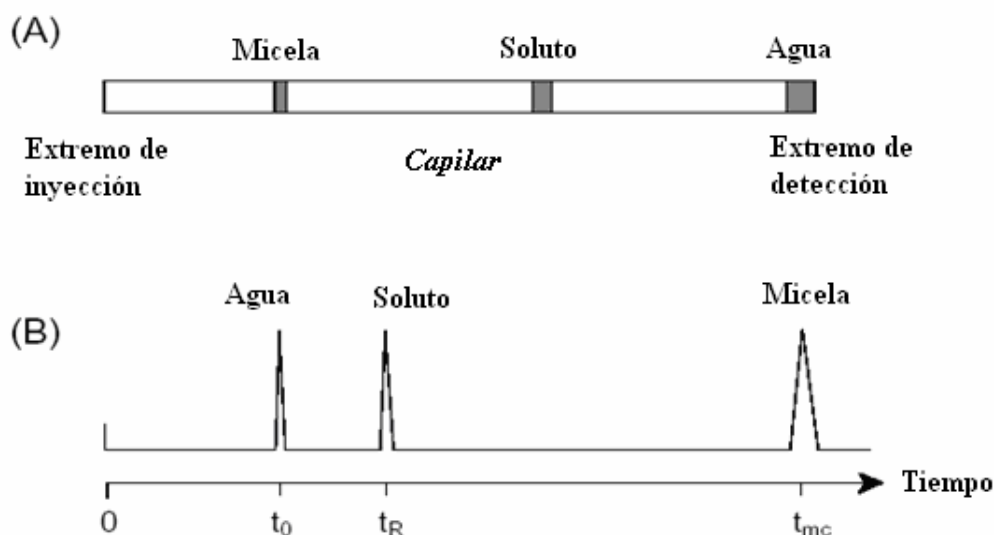
Los analitos no-iónicos (ni ionizables) sufren normalmente sólo migración electro-osmótica, y no pueden ser separados a menos que se encuentren asociados, en diferentes grados, con alguna especie iónica. La *cromatografía capilar electrocinética micelar* (MECC ó MECK, *micellar electrokinetic capillary chromatography*), que se desarrolla en electrolitos soporte acuosos, es el modo de EC más comúnmente utilizado para separar compuestos orgánicos neutros. En MECK se adicionan al medio tensioactivos iónicos en concentraciones superiores a su concentración micelar crítica. El principio de separación es, entonces, la partición diferencial de los analitos entre las micelas cargadas (usualmente llamadas *pseudo-fase*) y el electrolito acuoso. Estas soluciones micelares pueden solubilizar compuestos que, de otra forma, no podrían solubilizarse en el electrolito acuoso. Además, pueden separarse con el mismo electrolito de corrida tanto compuestos neutros como aquéllos que poseen carga propia [Terabe, 1992; Fritz, 2003].

Las condiciones estándar para la separación por MECK, las cuales permiten resolver un porcentaje alto de los problemas de separación de compuestos neutros, son:

- Electrolito soporte: SDS 50 mM en buffer borato 50 mM (pH 8,5 – 9,0), ó en buffer fosfato 50 mM si se desea pH 7.
- Solvente de la muestra: agua o metanol.
- Introducción de la muestra: en el extremo anódico del capilar

Cuando se emplea un tensioactivo aniónico, las micelas migran hacia el ánodo por electroforesis. El flujo electro-osmótico transporta la solución hacia el cátodo, debido a la carga negativa de las paredes del capilar. La velocidad electro-osmótica es generalmente mayor que la de migración

electroforética de las micelas en condiciones neutras o alcalinas, y por eso también las micelas son transportadas hacia el cátodo, a una velocidad retardada. Cuando un analito neutro es introducido en el capilar conteniendo la solución micelar, una fracción del compuesto se incorpora en el interior de la micela y migra a la velocidad del agregado. La fracción remanente permanece fuera de la micela, y migra a la velocidad del EOF. La velocidad de migración global del analito depende entonces del coeficiente de distribución entre la micela y la fase acuosa no-micelar: cuanto mayor sea el porcentaje de analito distribuido dentro de la micela, más lentamente migrará hacia el cátodo. Para separarse del resto de los compuestos neutros, el analito debe migrar a velocidades intermedias entre la velocidad electro-osmótica y la velocidad de la micela (ver Figura 4-A). En otras palabras, el tiempo de migración del analito neutro ( $t_{an}$ ) está limitado entre el tiempo de migración del seno de la solución ( $t_{EOF}$ ) y el tiempo de migración de la micela ( $t_{mc}$ ) (ver Figura 4-B). Esto es conocido también como *la ventana de migración* en MECK [Terabe, 1992].



**Figura 4:** Esquemas de (A) la separación de zonas en MECK y (B) un electroferograma de MECK

En forma similar a lo que ocurre en cromatografía, se define el factor de capacidad ( $k'$ ) como:

$$k' = n_{mc} / n_{aq} \quad \text{Ec. (8)}$$

donde  $n_{mc}$  y  $n_{aq}$  son la cantidad de analito incorporada en la micela y aquella en la fase acuosa, respectivamente.

Se puede obtener la relación entre el factor de capacidad y los tiempos de migración:

$$t_{an} = t_{EOF} [(1 + k') / (1 + k' t_{EOF}/t_{mc})] \quad \text{Ec. (9)}$$

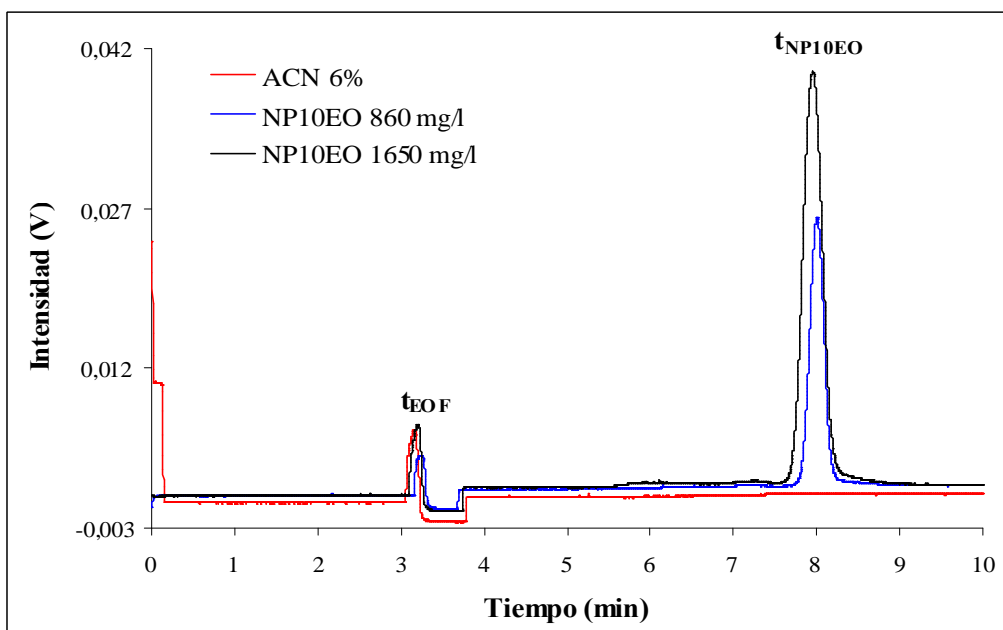
Cuando  $k'$  es 0, es decir, cuando el analito neutro no interactúa para nada con la micela, su tiempo de migración es  $t_{EOF}$ . Cuando  $k'$  es infinito, o sea, cuando el analito está incorporado totalmente dentro de la micela, su tiempo de migración se transforma en  $t_{mc}$ .

Es de esperar, entonces, que compuestos muy hidrofóbicos se particionen tan fuertemente dentro de las micelas que, en las condiciones estándar de MECK, eluyan en una ventana sumamente estrecha, muy cercanos a la propia micela [Fritz, 2003].

En el caso de nuestros analitos, por un lado, el carácter altamente lipofílico de los alquilfenoles (4-NP, 4-OP) los hace tan solubles en las micelas de SDS que ha sido muy difícil determinarlos selectivamente en MECK ordinaria [He y Lee, 1996; Takeda *et al.*, 2000]. El problema de la separación de compuestos altamente hidrofóbicos y fuertemente relacionados se ha solucionado principalmente mediante el uso de la MECK modificada con ciclodextrinas (CD/MECK). Las ciclodextrinas pueden incluir selectivamente a los solutos, dependiendo del tamaño de su cavidad hidrofóbica. Así, se ha logrado separar 4-NP de 4-OP, e incluso se ha llegado a obtener una buena separación de isómeros ramificados de 4-NP [He y Lee, 1996; Takeda *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2003], constituyendo una opción interesante para la determinación de los metabolitos lipofílicos de los AP $n$ EO.

Por el otro lado, se presentaba el problema de la separación de los compuestos anfifílicos, los polietoxilatos. En la Figura 5 se muestran los electroferogramas obtenidos a partir de la inyección de NP10EO en condiciones estándar de MECK. Se utilizó un BGE compuesto por SDS 50 mM en buffer borato 50 mM (pH 8). La muestra se introdujo disuelta en 6% acetonitrilo en agua, en el extremo anódico del capilar. El solvente de introducción de la muestra daba un pico de absorción en el UV que fue utilizado como marcador del flujo electro-osmótico [Shi y Fritz, 1995].

Las corridas electroforéticas resultaron en un único pico, correspondiente a la suma de todos los oligómeros etoxilados que componen el NP10EO, los cuales no mostraron diferencias en su distribución en la pseudo-fase micelar. Aún cuando se trata de moléculas con cierto carácter hidrofílico (el cual aumenta con el número de grupo etoxilo), el hecho observado puede ser atribuido a la formación de micelas mixtas entre el tensioactivo no-iónico y el SDS del electrolito de corrida [Rosen, 1989].



**Figura 5:** Electroferogramas de NP10EO 860 mg/l y 1650 mg/l en 6% acetonitrilo en agua, y de 6% acetonitrilo en agua. BGE: SDS 50 mM en buffer borato 50 mM (pH 8). Condiciones instrumentales:  $V = 10$  kV,  $T = 25$  °C, longitud de onda de detección = 195 nm, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s. Se indican en la figura las zonas atribuidas a los analitos y al flujo electro-osmótico.

Se pensó entonces que una segunda opción derivada de la MECK, conocida como *asociación solvofóbica*, podía resultar una buena alternativa a la hora de determinar simultáneamente los polietoxilatos y sus metabolitos lipofílicos.

### 3.1.2. ASOCIACIÓN SOLVOFÓBICA

La fuerza impulsora de la formación de micelas en agua como solvente puede ser explicada en términos de interacciones hidrofóbicas: existe una tendencia a minimizar el contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas de los anfífilos a través de la formación de agregados, en los cuales la porción hidrofóbica está apantallada del agua por el grupo polar de la molécula. Para cualquier



tensioactivo, independientemente de su carga, la adición de solventes orgánicos que permanezcan localizados principalmente en el seno de la solución hará el proceso de micelización menos espontáneo, debido a que las mezclas agua-solvente orgánico son en general mejores solventes para las moléculas de tensioactivo que el agua pura [Moyá *et al.*, 2007]. Si la interacción de los extremos hidrocarbonados del tensioactivo con las moléculas de un solvente no acuoso pudiera ser tan favorable como con las cadenas no polares de otras moléculas de tensioactivo, esto podría conducir efectivamente a la inhibición de la formación de micelas [Shi y Fritz, 1995]. Por otra parte, Beesley y col. [Beesley *et al.*, 1988] encontraron evidencia de que la agregación de anfifilos para formar micelas, vesículas y bicapas sólo ocurriría en solventes con capacidad de formar uniones puente de hidrógeno múltiples. El acetonitrilo pertenecería entonces a una clase de solventes polares que no favorecerían la formación de micelas.

Misra y col. [Misra *et al.*, 1991] encontraron que en mezclas acuosas las concentraciones micelares críticas del SDS crecen a medida que aumenta la fracción molar de ACN, pasando de  $8.2 \cdot 10^{-3}$  M en agua pura a  $44 \cdot 10^{-3}$  M en 24% ACN (a 25 °C); para concentraciones mayores del solvente orgánico, no observaron cambios asociados a la formación de micelas a través de ninguna de las dos técnicas utilizadas en sus estudios (métodos conductimétrico y espectral), por lo que podría asumirse que sólo existen moléculas individuales del tensioactivo en solución. Otros investigadores [Seifar *et al.*, 1997] sostienen que cuando la concentración de SDS supera el orden de  $10 \cdot 10^{-3}$  M la micelización ocurre aún para contenidos de ACN de hasta 40%, pero hay ciertos rasgos que diferencian al sistema de su comportamiento en agua pura. Según estos autores, las primeras micelas siguen apareciendo para concentraciones del tensioactivo de alrededor de  $10 \cdot 10^{-3}$  M, pero tanto la concentración de los agregados como la de los iones individuales crece de forma gradual con el aumento de la concentración de SDS, y además existe una distribución de tamaños de los agregados más amplia que en agua pura, prevaleciendo los más pequeños.

Si bien el grado de asociación de las moléculas de tensioactivo en presencia de cantidades considerables de solventes como el acetonitrilo puede resultar un tema de controversia para distintos autores, es lógico pensar que las variaciones en las propiedades micelares que ocurrirán a raíz de la adición de solventes orgánicos al BGE modificarán también los mecanismos de separación electroforética [Seifar *et al.*, 1997].

En 1986, Walbroehl y Jorgenson [Walbroehl y Jorgenson, 1986] presentaron la separación electroforética de varios hidrocarburos aromáticos policíclicos (compuestos neutros e hidrofóbicos, entre ellos naftaleno, pireno y 9-metilantarceno), en un medio que consistía en el tensioactivo catiónico perclorato de tetrahexilamonio (THAP) disuelto en acetonitrilo, con el agregado de cantidades variables de agua. Obtuvieron la mejor separación para THAP 25 mM en ACN/agua 50:50 (en volumen). En dicho medio, las moléculas de los analitos experimentaron *interacción (o asociación) solvofóbica* con los iones tetrahexilamonio ( $\text{THA}^+$ ), formando especies cargadas positivamente. Los solutos más grandes, con mayor carácter no-polar, fueron los que migraron más rápidamente hacia el cátodo, indicando el mayor grado de interacción con el ion  $\text{THA}^+$ . El óxido de mesitilo, una molécula pequeña y polar, presentó movilidad baja, indicando una menor interacción con el  $\text{THA}^+$ . Cuando el contenido de agua alcanzó el 30%, las movilidades de los analitos comenzaron a crecer rápidamente, ya que para concentraciones altas de agua, los solutos hidrofóbicos se vieron forzados a interactuar más fuertemente con el  $\text{THA}^+$ . Basados en distintas evidencias experimentales, los autores sugirieron que el mecanismo de migración involucraba un equilibrio dinámico entre una especie asociada con una carga positiva y una disociada sin carga. Este mecanismo podría representarse por el siguiente modelo:



donde S es el soluto y  $\text{L}^+$  es el ligando ( $\text{THA}^+$  en este caso). La posibilidad de que una molécula de soluto se combinara con más de una de ligando fue descartada por los autores.

La separación electroforética de homólogos de tipo alquilfenol-etoxilados fue publicada por primera vez por Bullock [Bullock, 1993; Heinig y Vogt, 1999], utilizando una derivación del mecanismo descrito inicialmente por Walbroehl y Jorgenson. El buffer aplicado (borato 25 mM, pH 8,6) contenía SDS y acetonitrilo en concentraciones altas (SDS 50 mM, ACN 35%). El autor confirmó experimentalmente que, para contenidos de ACN mayores que 30%, no ocurría formación de micelas de SDS. Obtuvo la separación de etoxímeros para formulaciones de tipo Triton X- (polietoxilatos de octilfenol), basándose en la formación de complejos de asociación (cargados negativamente) entre las moléculas anfifílicas de los analitos y el tensioactivo aniónico componente del electrolito soporte. Aún cuando -según lo probado experimentalmente por el autor- la estructura micelar se encontraba esencialmente destruida, las porciones hidrofóbicas de las moléculas individuales de SDS podían asociarse con las porciones hidrofóbicas de los oligómeros del Tritón.

Algunos años más tarde, Heinig y col. [Heinig *et al.*, 1997] estudiaron la separación de oligómeros de NP $n$ EO y OP $n$ EO a través del empleo de tensioactivos aniónicos de tipo sulfato y sulfonato de sodio (octil- y dodecilsulfato, octil- y decilsulfonato) en concentraciones superiores a sus CMC como aditivos de electrolitos fosfato y borato, en presencia de cantidades altas (> 20%) de solventes orgánicos polares (acetonitrilo, metanol, etanol e isopropanol), empleando detección UV a 200 nm. Las mejores condiciones de separación las encontraron cuando utilizaron SDS (40-100 mM) y ACN (20-50%) en buffer fosfato [Heinig *et al.*, 1997; Heinig y Vogt, 1999].

Se decidió entonces encarar la separación de mezclas de un producto comercial de tipo NP10EO, y los metabolitos estrogénicos NP, NP1EO, NP2EO y NP1EC, con el agregado de 2,4,6-trimetilfenol (TMP) y ácido 4-bromofenil acético (BPA) para ser evaluados como estándares internos, a través de la explotación de interacciones lipofílicas entre los analitos no-iónicos (NP $n$ EO) y ionizables (NP, NP1EC, TMP y BPA) y el tensioactivo aniónico SDS, en presencia de concentraciones elevadas de ACN.

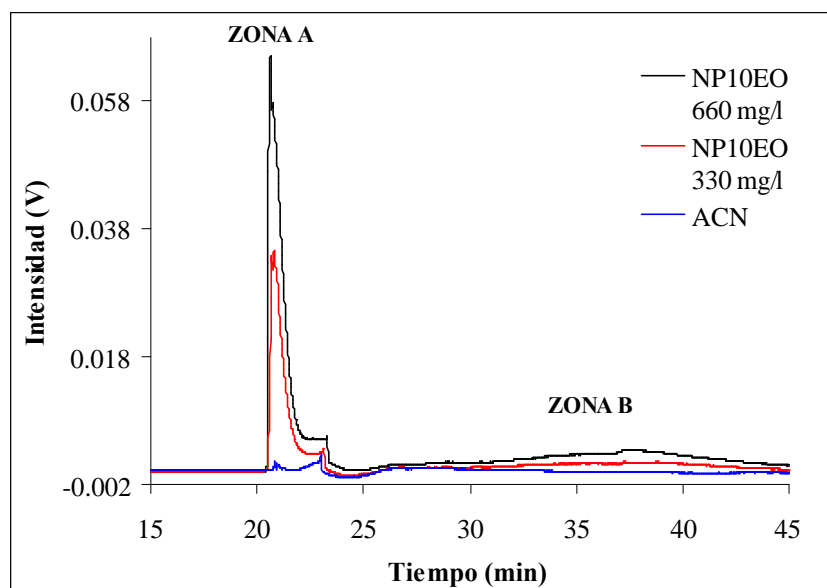
### **3.1.2.a. Comportamiento electroforético de los analitos**

Las primeras condiciones ensayadas fueron las siguientes:

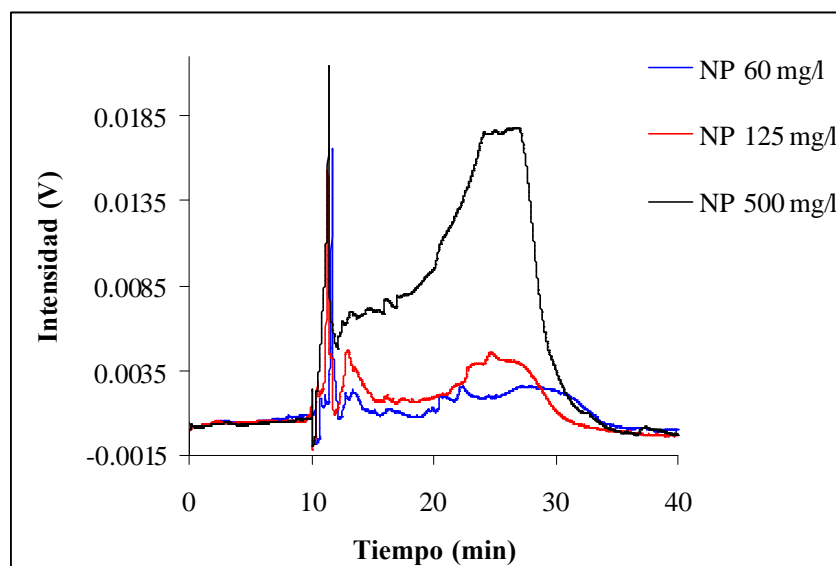
- Electrolito soporte: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8.
- Muestras: NP10EO y NP en acetonitrilo
- Introducción de la muestra: en el extremo anódico del capilar

Los resultados obtenidos no fueron buenos. En la Figura 6 se muestran los electroferogramas correspondientes a la inyección de NP10EO en concentraciones de 330 y 660 mg/l, y NP en concentraciones de 60, 125 y 500 mg/l (todos disueltos en acetonitrilo).

(a)



(b)



**Figura 6:** Electroferogramas de (a) NP10EO en concentraciones 330 y 660 mg/l en acetonitrilo, y acetonitrilo; (b) NP en concentraciones 60, 125, y 500 mg/l en acetonitrilo. BGE: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8. Condiciones instrumentales: (a) V = 5 kV, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 5 s; (b) V = 10 kV, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s. T = 25 °C, longitud de onda de detección = 200 nm.

Por empezar, no fue fácil reconocer los tiempos de aparición de los diferentes grupos de compuestos. En el caso del NP10EO, parecían distinguirse dos zonas (identificadas como A y B en la Figura 6-a) que crecían en forma proporcional a la concentración de la solución inyectada. La primera de ellas (zona A), aparecía a la velocidad del flujo electro-osmótico. Podría decirse, entonces, que el tiempo de migración de la mezcla de homólogos se encontraba entre los 20 y los 45 minutos (para un potencial aplicado de 5 kV), y que la resolución en función de la longitud de cadena etoxilada era prácticamente nula. En cuanto a las soluciones de NP, fue necesario inyectar una de altísima concentración (500 mg/l) para identificar de forma inequívoca la zona de migración, ya que para la inyección de concentraciones menores no resultaba clara la distinción entre distorsiones de la línea de base y la aparición del analito (ver Figura 6-b). Pudo concluirse así que el NP migraba en una zona extremadamente ancha del electroferograma (entre los 10 y los 35 minutos, para un potencial de corrida de 10 kV).

Una posible causa para una eficiencia pobre en EC es la inyección de volúmenes de muestra demasiado grandes [Grossman, 1992]. Sin embargo, tanto para tiempos de 5 como de 2,5 segundos de introducción hidrodinámica de muestra con una presión aplicada de 0,8 psi los resultados fueron equivalentes. Tampoco la disminución del potencial aplicado de 10 a 5 kV mejoró la apariencia de los electroferogramas.

Se pensó entonces que la pérdida de eficiencia y de resolución podía deberse a la gran diferencia de conductividades desarrollada en el capilar entre la zona de inyección de muestra, de conductividad bajísima (sustancias no-iónicas disueltas en un solvente orgánico aprótico) y el electrolito soporte, de conductividad elevada. Si la conductividad de la muestra es tanto menor, el campo eléctrico se vuelve muy grande a través de esa zona y disminuye significativamente a lo largo del resto del capilar. Este efecto puede resultar en una reducción significativa de las velocidades de migración de los solutos y, en consecuencia, en un notable ensanchamiento de los picos [Grossman, 1992].

Un hecho con algunas características similares había sido observado por He y Lee [He y Lee, 1996] durante la separación de isómeros de 4-NP por CD-MECK. En esa oportunidad los autores investigaron el efecto que tenía la conductividad de la muestra en la separación de isómeros. Cuando disolvieron el 4-NP en metanol puro, todos los isómeros aparecieron agrupados e irresueltos, aún cuando utilizaron el BGE optimizado. Luego disolvieron la muestra en agua-metanol (50:50) conteniendo soluciones 12,5 y 25 mM en SDS, cuyas conductividades eran respectivamente 1/12 y 1/6 de la del buffer de separación (borato 25 mM, SDS 20 mM, CD). Los

resultados indicaron que la concentración de SDS óptima era 12,5 mM, para la cual los picos estaban completamente separados.

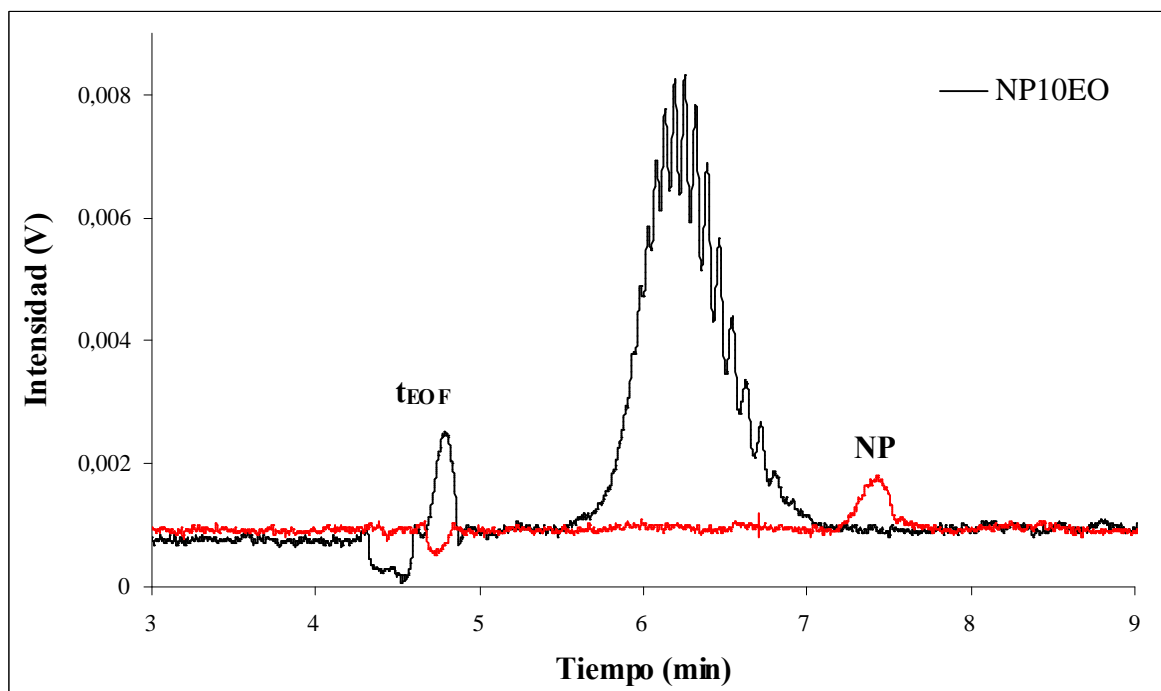
Así, con el objeto de reducir la diferencia de conductividad entre la zona de muestra y la zona de BGE circundante, algunos de los componentes del BGE fueron agregados a las muestras.

Se obtuvieron resultados altamente satisfactorios bajo las siguientes condiciones experimentales:

- Electrolito soporte: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8
- Muestras: disueltas en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM (pH 6,8), acetonitrilo 40%
- Tiempo de inyección hidrodinámica (0,8 psi): 2,5 seg
- Potencial de corrida: 15 kV
- Introducción de la muestra: en el extremo anódico del capilar
- Longitud de onda de detección: 200 nm

En la Figura 7 se muestran los electroferogramas correspondientes a la inyección de NP10EO y NP en las condiciones detalladas más arriba. El contraste con la apariencia de los electroferogramas en la Figura 6 es notable.

Pudimos concluir en esta parte inicial del trabajo que la separación de nuestros analitos se ve fuertemente afectada por la diferencia de conductividades entre la solución de la muestra y el electrolito soporte. Si bien es reconocido que la introducción de la muestra es un procedimiento crucial en electroforesis capilar, comparado con la separación de la mayoría de otros compuestos el efecto observado fue muy notorio, lo cual podría deberse a que las diferencias en las movilidades efectivas entre las diferentes moléculas son muy pequeñas [He y Lee, 1996].

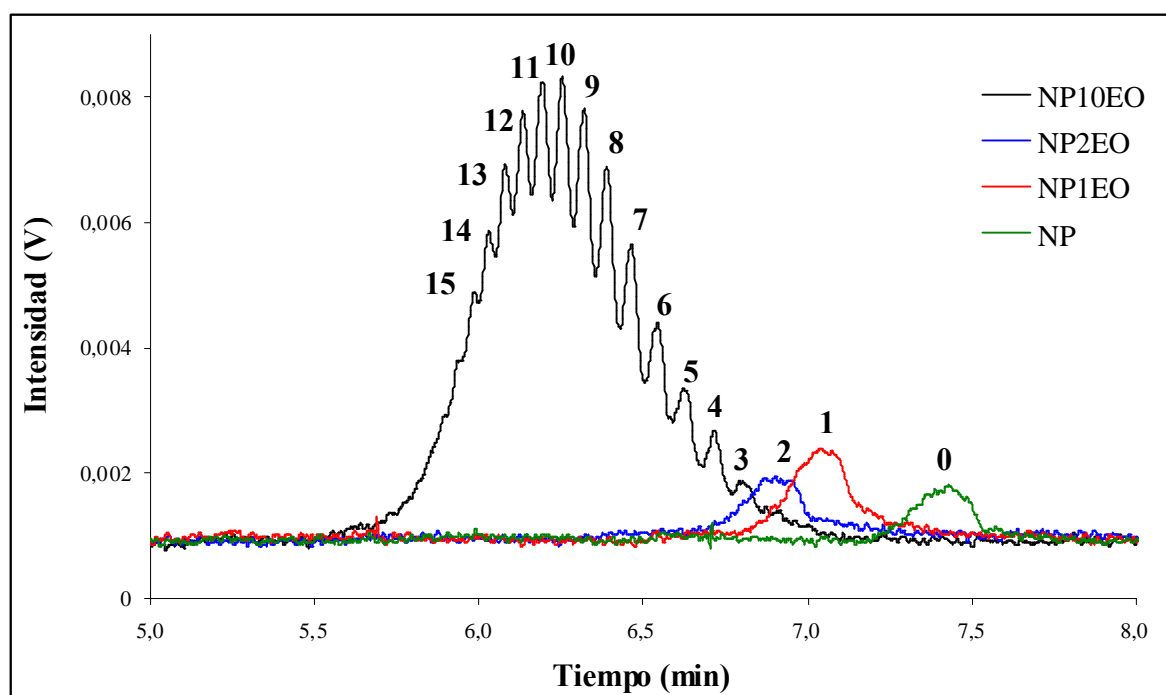


**Figura 7:** Electroferogramas superpuestos de NP10EO 660 mg/l y NP 20 mg/l, ambos en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM (pH 6,8), acetonitrilo 40%. BGE: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s; longitud de onda de detección = 200 nm.

En la Figura 8 se presenta una ampliación de los electroferogramas de la Figura 7, con el agregado de las corridas de los compuestos con 1 y 2 grupos etoxilo (NP1EO y NP2EO, respectivamente). Si bien la resolución de homólogos etoxilados no fue completa, sí fue posible distinguir e identificar las moléculas con  $0 < n < 15$  (donde  $n = 0$  corresponde al nonilfenol). La asignación de picos para  $n \geq 3$  se hizo basándose en su secuencia de migración [Bullock, 1993; Oudhoff *et al.*, 2003].

Al aplicar un potencial positivo, el flujo electro-osmótico se dirigió hacia el extremo de detección del capilar (el catódico), y el aditivo aniónico (el SDS) migró en dirección opuesta. Dado que la movilidad electro-osmótica es mayor (en valor absoluto) que la movilidad electroforética de los complejos con carga negativa formados entre el SDS y las moléculas homólogas de los analitos, la movilidad neta de estos últimos resulta positiva (o sea, hacia la ventana de detección). En este modo de separación de contra-migración, los tiempos de migración se hacen más largos a medida que el vector electroforético (negativo) y el vector electroosmótico (positivo) se acercan en magnitud; la obtención de tiempos de migración largos es una forma de mejorar la resolución de moléculas de estructuras químicas similares [Shi y Fritz, 1995]. Debido a la naturaleza del

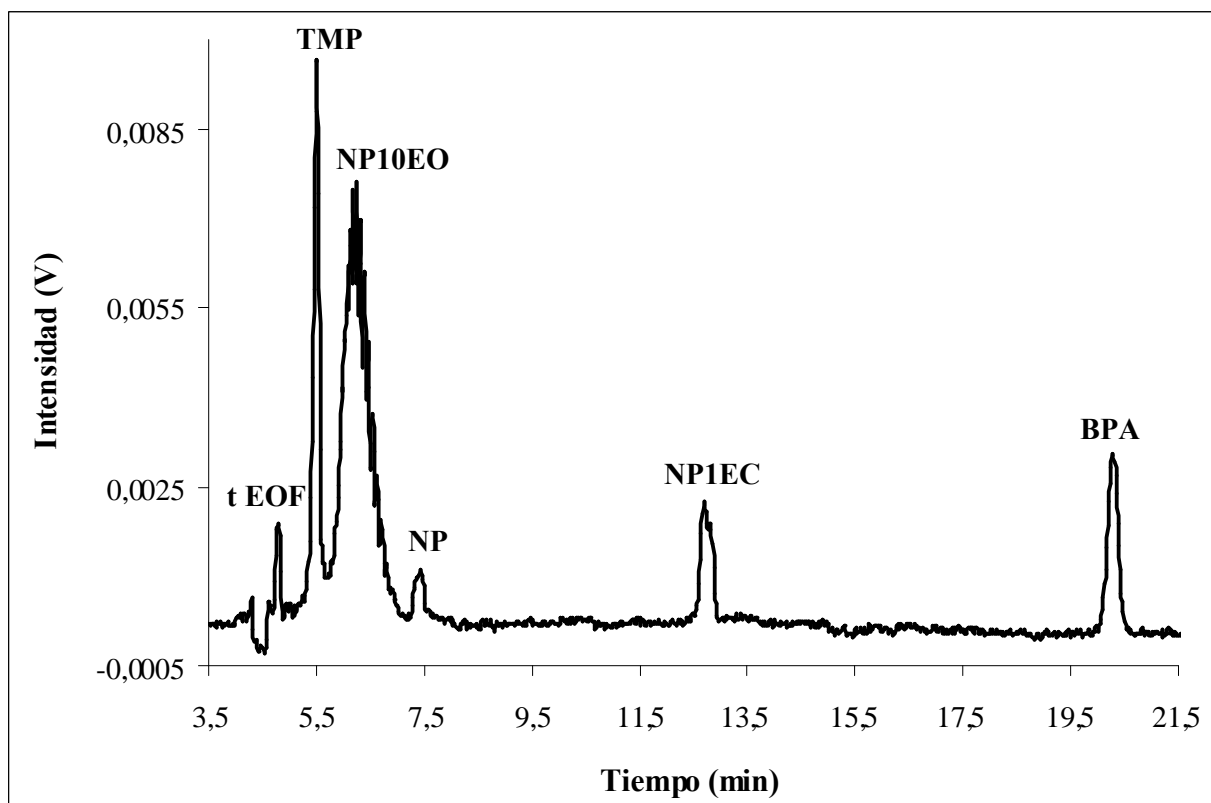
mecanismo de separación, los homólogos son separados en función de las diferentes longitudes de cadena polietoxilada ( $nEO$ ): la velocidad de migración de los analitos hacia el cátodo crece y la de contra-migración hacia el ánodo disminuye con el aumento del carácter hidrofílico de la molécula (es decir, con  $nEO$ ) [Bullock, 1993; Heinig *et al.*, 1997].



**Figura 8:** Electroferogramas superpuestos de NP10EO 660 mg/l, NP2EO 14 mg/l, NP1EO 16 mg/l y NP 20 mg/l, todos en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM (pH 6,8), acetonitrilo 40%. Los números sobre los picos indican el número de unidades etoxilo en la molécula correspondiente. BGE: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8. Condiciones instrumentales:  $V = 15$  kV, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s; longitud de onda de detección = 200 nm.

Bajo las mismas condiciones experimentales, se corrió una mezcla de NP10EO y los metabolitos estrogénicos NP y NP1EC, y los estándares internos potenciales TMP y BPA. La separación resultante se muestra en la Figura 9.

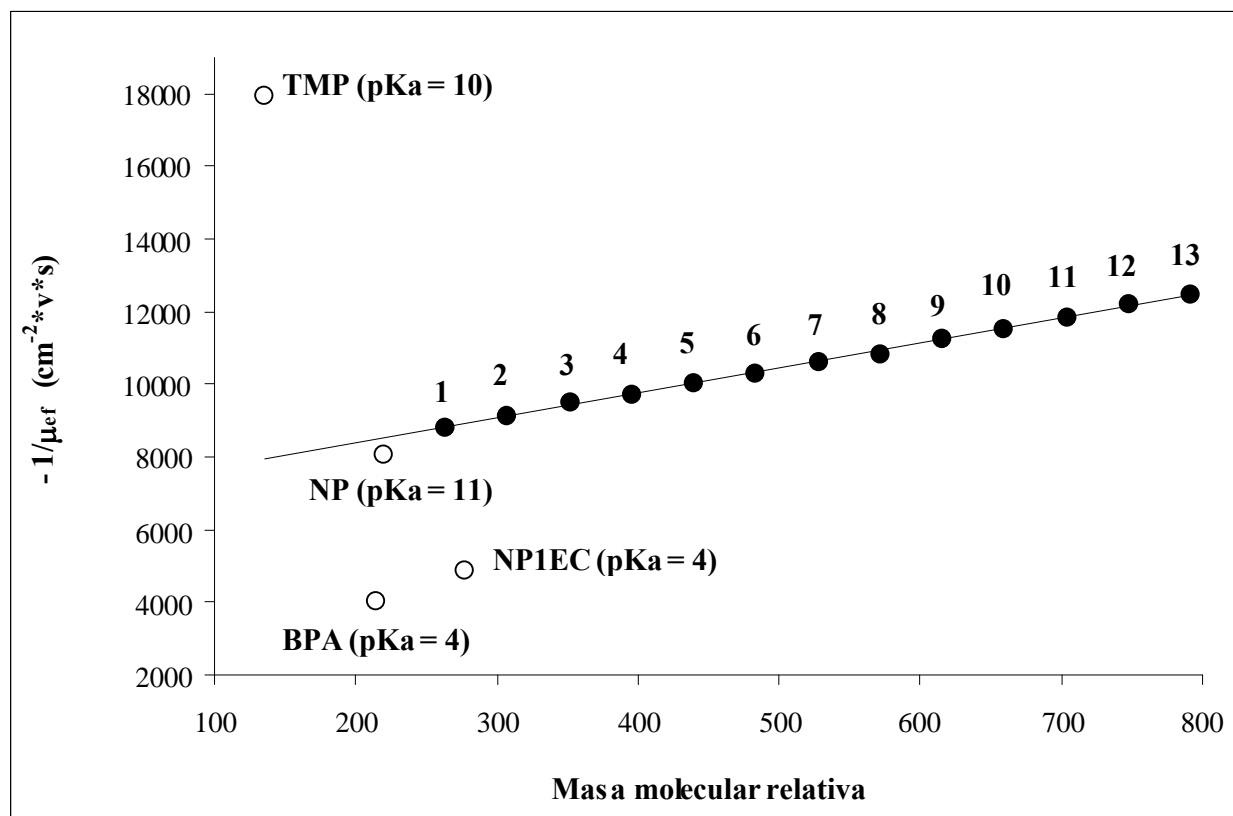




**Figura 9:** Inyección de una mezcla de TMP 20 mg/l, NP10EO 660 mg/l, NP 20 mg/l, NP1EC 20 mg/l y BPA 20 mg/l, disuelta en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM (pH 6,8), acetonitrilo 40%. BGE: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s; longitud de onda de detección = 200 nm.

Se encontró al TMP y al BPA con un buen potencial para ser utilizados como estándares internos, dado que migraron separados de los analitos y del EOF. En el caso del BPA, se pensó en la eventual aplicación de un gradiente de potencial para acelerar su velocidad de migración y disminuir el tiempo de corrida.

Un análisis más minucioso de estos resultados surge a partir del gráfico de la Figura 10, donde se representa la variación de las movilidades electroforéticas (hacia el ánodo) en función de la masa molecular relativa de cada analito. En la figura también se indican los pKa (aproximados, en agua y a temperatura ambiente) de los compuestos ionizables.



**Figura 10:** Valor absoluto de la inversa de las movilidades electroforéticas en función de la masa molecular relativa de los analitos. Los círculos blancos corresponden a TMP, BPA, NP1EC y NP. Los círculos negros corresponden a los homólogos etoxilados de NP<sub>n</sub>EO, cuyo *n* se indica en el gráfico.

Teniendo en cuenta que estamos en presencia de un medio 60% acuoso (pH 6,8) – 40% solvente aprótico, pueden sacarse las siguientes conclusiones generales acerca del comportamiento encontrado para los diferentes compuestos:

El grado de disociación del TMP (cuyo pKa será cercano a 10) será prácticamente despreciable en las condiciones del experimento, por lo que su movilidad electroforética hacia el ánodo será sólo debida a su asociación con moléculas de SDS. Dicho trimetilfenol es la molécula de menor masa y sin embargo es la que tiene menor movilidad hacia el ánodo, es decir, es aquella con menor relación  $q(-)/f$ . El comportamiento encontrado se deberá, entonces, a que su grado de asociación con SDS es muy pequeño; y esto tiene sentido, ya que es de esperar que compuestos neutros pequeños presenten una capacidad de complejación más débil con el tensioactivo aniónico que compuestos hidrocarbonados más grandes, altamente hidrofóbicos [Fritz, 2003].

Luego siguen, en cuanto a la magnitud de las movilidades, el NP ( $pK_a \sim 11$ ) y los NP $n$ EO's. Tampoco dichas moléculas estarán disociadas en un medio de estas características, por lo que su movilidad electroforética hacia el ánodo será, nuevamente, sólo debida a su asociación con moléculas de SDS. A pesar de ser más pesados que el TMP (mucho más cuanto mayor es  $n$ ), todos estos compuestos se mueven más rápidamente hacia el electrodo negativo que el trimetilfenol: el grado de asociación con el tensioactivo aniónico es mucho mayor, debido a la elevada hidrofobicidad de la cadena hidrocarbonada C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>.

Por otra parte, los NP $n$ EO presentan una respuesta lineal. Según lo propuesto por Bullock [Bullock, 1993] los oligómeros individuales de NP $n$ EO se asociarían, en principio, con la misma cantidad de moléculas de SDS, ya que todos los etoxímeros poseen el mismo grupo hidrófobo (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>-Ph). La tendencia observada en el gráfico de la Figura 10 parece confirmar esta presunción: el valor absoluto de la inversa de la movilidad electroforética es inversamente proporcional al aumento de la masa del etoxímero (44 u.m.a. por grupo etoxilo). El hecho de que la velocidad de migración sea sólo función de la masa molecular del homólogo etoxilado indicaría que tanto la masa de SDS que se suma, como la carga negativa del complejo formado, tienen siempre el mismo valor independientemente de qué etoxímero se trate (el NP se desvía levemente de este comportamiento, pero esto no es llamativo dado su carácter de fenol, el cual lo diferencia de los etoxilatos con  $n \geq 1$ ). En un trabajo de Oudhoff y col. [Oudhoff *et al.*, 2003], los autores encontraron un comportamiento similar en el caso de la separación de oligómeros de poli-etilenglicol (PEG) derivatizados con fenil isocianato, en BGE's compuestos por bórax, SDS y tetrahidrofurano. La recíproca de las movilidades electroforéticas de los derivados en función del número de unidades monoméricas resultó en gráficos lineales, por lo que los autores concluyeron que los agregados formados entre el SDS y los grupos terminales derivatizados de los analitos (grupos hidrófobos y neutros) tenían una carga constante, mientras que la longitud de la cadena polietoxilada determinaba el tamaño (y por ende las propiedades friccionales) de esos agregados.

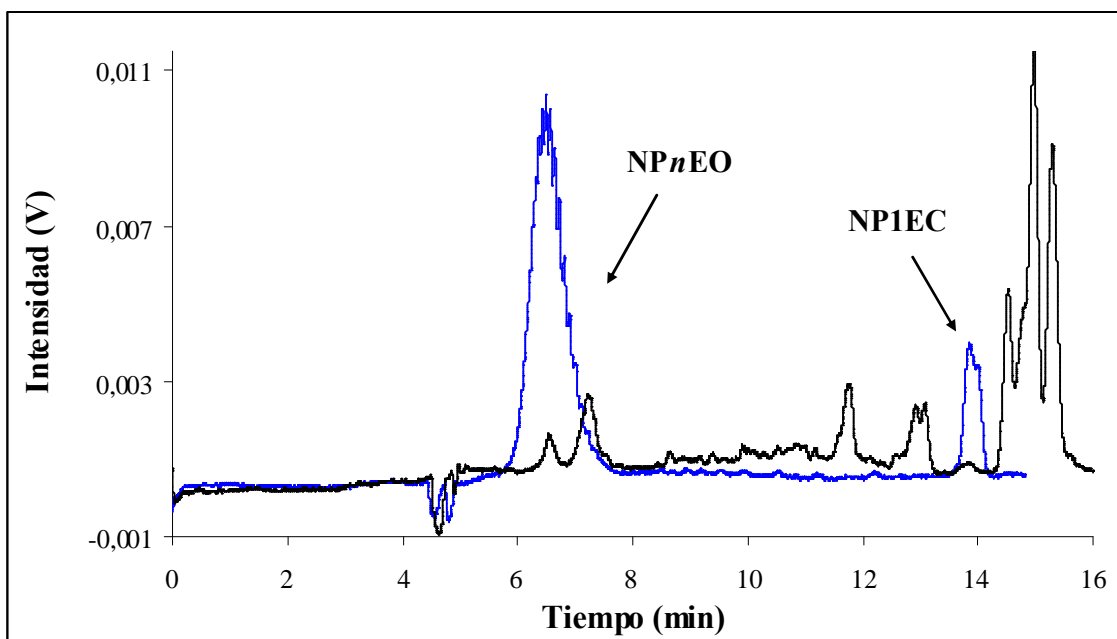
Finalmente, es evidente que el NP1EC y el BPA (cuyos  $pK_a$  estarán alrededor de 4) son los compuestos que presentan las mayores velocidades hacia el ánodo. Por tratarse de ácidos carboxílicos, es de esperar que el grado de disociación de ambas sustancias sea considerable en un medio que es en un 60% una solución acuosa de pH 6,8, aún en presencia de 40% de ACN. Entonces, su movilidad electroforética será debida a su carga negativa propia, además de a su eventual asociación con moléculas de SDS. Por eso, estos resultan los compuestos con mayor movilidad hacia el ánodo: son los que poseen mayor carga negativa neta, y sus masas se encuentran en la zona de masas bajas, con valores cercanos a las de NP y NP1EO.

En este punto del desarrollo experimental, se estableció una colaboración con dos grupos de investigación que trabajan conjuntamente en el estudio de la degradación biológica de los NP $n$ EO, en reactores de tipo batch y semi-continuos operados bajo diferentes condiciones de aceptores de electrones. Dichos grupos pertenecen al Centro de Investigación en Ingeniería Ambiental del INTI (CIIA-INTI) y al Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular del CONICET (INGEBI-CONICET). Extendida a lo largo de todo el trabajo de tesis, la interacción interdisciplinaria con estos grupos permitió en varias ocasiones evaluar las metodologías analíticas en estudio a través de su aplicación en casos reales.

Los resultados logrados con el método electroforético descrito más arriba representaron los primeros datos analíticos a los que tuvieron acceso los investigadores. Se colaboró en el desarrollo y puesta a punto de un procedimiento para la extracción en fase sólida y concentración de un producto comercial NP10EO a partir de la fase acuosa sobrenadante de los reactores, utilizando un adsorbente de C-18 y acetato de etilo o acetonitrilo como eluyentes. Con el mencionado método de EC, se evaluó la recuperación de los analitos luego del enriquecimiento y pudo así mejorarse el procedimiento hasta obtener una recuperación de aproximadamente 70% (como suma de oligómeros).

La primer muestra analizada fue el sobrenadante del ensayo de biodegradabilidad *ISO 9898*, el cual consiste esencialmente en un reactor de tipo batch operado en condiciones aeróbicas. Luego de 28 días de la alimentación del reactor con NP10EO, se tomaron 250 ml del sobrenadante (cuya concentración de partida era de 297 mg/l de NP10EO), se los filtró a través de una membrana de fibra de vidrio, se los extrajo sobre la fase sólida de C-18 y se eluyó con 1,2 ml de acetonitrilo (*muestra NAt28*). El volumen completo del extracto orgánico fue llevado a 3 ml por adición de los componentes necesarios para la inyección de muestra en electroforesis capilar. La confirmación de la identidad de los analitos se llevó a cabo por adición estándar de NP10EO 230 mg/l y NP1EC 2,5 mg/l a la muestra.

En la Figura 11 se muestran superpuestos los electroferogramas de la muestra y de una mezcla estándar de NP10EO y NP1EC, cuyas zonas de migración se señalan con flechas.



**Figura 11:** Inyección de una mezcla de NP10EO 660 mg/l y NP1EC 20 mg/l (trazo azul), y de la muestra NAT28 (trazo negro), ambas en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM (pH 6,8), acetonitrilo 40%. BGE: SDS 49 mM, acetonitrilo 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8. Condiciones instrumentales:  $V = 15$  kV, tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s; longitud de onda de detección = 200 nm.

Teniendo en cuenta un factor de concentración ( $f_c$ ) de 83,3 ( $f_c = V_o/V_f = 250$  ml / 3 ml) y una recuperación del 70% luego del enriquecimiento, la concentración de partida daría una solución para inyección en CE de aproximadamente 17 g NP10EO/l. En la figura, donde se compara la muestra con una solución de 0,6 g NP10EO/l, se puede observar la desaparición casi completa de los etoxímeros con  $n$  alrededor de 10, y puede observarse también la acumulación de moléculas con un número de grupos etoxilo menor que 4. Se detectó, además, la presencia del metabolito ácido, el NP1EC (cuya formación en condiciones aeróbicas ha sido reportada en la literatura).

### 3.1.2.b. Selección de las condiciones de trabajo

El conjunto de resultados obtenidos demostró que la determinación electroforética de los NP $n$ EO y sus compuestos asociados, en su modo de *asociación solvofóbica*, presentaba interés tanto desde el

punto de vista fundamental como desde el de la aplicación práctica. Por eso, se decidió estudiar con profundidad el efecto de las múltiples variables involucradas en la separación y en la cuantificación a través de un enfoque quimiométrico multivariado [Altria *et al.*, 1995]. En cuanto al efecto sobre la separación de los analitos, la composición del electrolito de corrida surge inmediatamente como un punto clave. En este sentido, las variables a examinar eran la concentración de aditivo aniónico (SDS) y de solvente orgánico (ACN), y la concentración y el pH del buffer fosfato. Dada la relevancia hallada en los primeros experimentos para el efecto de la composición de la solución de muestra en la separación, se decidió explorar esas mismas variables en la composición de la muestra. Todos estos factores podrían tener también un efecto sobre la relación señal/ruido y por lo tanto sobre la cuantificación de los analitos. Desde el punto de vista instrumental, los factores que en primera instancia podrían resultar relevantes tanto en la separación como en la sensibilidad eran el potencial de corrida, la temperatura del capilar y el tiempo de inyección hidrodinámica.

Los métodos multivariados involucran la alteración simultánea de un conjunto de parámetros experimentales de acuerdo a un régimen predefinido. Se planificó entonces, como primer paso, un diseño estadístico de filtrado de variables (*screening design*) con el objeto de reconocer los parámetros más importantes, es decir, aquéllos que provocaran efectos significativos en la resolución, la sensibilidad y el tiempo de análisis. Cuando hay muchas variables experimentales en juego es deseable hacer primero este tipo de diseño experimental, para luego continuar trabajando sólo con los factores que más fuertemente influyen en el resultado final [Massart *et al.*, 1997; Mikaeli *et al.*, 2001].

En este punto, no estábamos interesados en detectar interacciones entre variables y, por otra parte, deseábamos lograr nuestro objetivo con un número de experimentos pequeño. Por eso, se eligió el procedimiento de Plackett-Burman (P-B) para 11 factores (en términos quimiométricos, las variables son llamadas indistintamente *factores*) y 2 niveles. Este es un tipo de diseño muy recomendable cuando el número de factores es mayor que 7 debido a la gran economía de experimentos [Massart *et al.*, 1997]; además, se ha reportado su uso exitoso en numerosas aplicaciones de EC [Vindevogel y Sandra, 1991; Rogan *et al.*, 1994; Mikaeli *et al.*, 2001; Sun y Lin, 2001]. Se trata de arreglos donde con un número de experimentos ( $N_{exp}$ ) múltiplo de 4 se puede estudiar hasta  $N_{exp} - 1$  factores. Así, para investigar la relevancia de las 11 variables de nuestro interés (descriptas en la Tabla 1), un número total de 12 condiciones experimentales diferentes resultaría suficiente [Massart *et al.*, 1997].

**Tabla 1**

<b>N° de variable</b>	<b>Descripción de la variable</b>	<b>Valor mínimo (nivel -)</b>	<b>Valor máximo (nivel +)</b>
<b>1</b>	Concentración de SDS en BGE (mM)	20	70
<b>2</b>	% (v/v) de ACN en BGE	20	50
<b>3</b>	Concentración de fosfato en BGE (mM)	5	10
<b>4</b>	pH del BGE	6	8
<b>5</b>	Concentración de SDS en muestra (mM)	20	70
<b>6</b>	% (v/v) de ACN en muestra	20	50
<b>7</b>	Concentración de fosfato en muestra (mM)	1	10
<b>8</b>	pH de la muestra	6	8
<b>9</b>	Potencial de corrida (kV)	5	10
<b>10</b>	Temperatura del capilar (°C)	20	30
<b>11</b>	Tiempo de inyección a 0,8 psi (seg)	2	5

La elección de las funciones de respuesta ( $y$ ) es también un punto clave durante la optimización de un sistema multivariado. En nuestro caso, un grupo reducido pero relevante de respuestas estaría conformado, en principio, por las resoluciones de los pares NP/NP1EO, NP1EO/NP2EO y NP2EO/NP3EO (por tratarse de los metabolitos más persistentes y aquéllos cuya determinación cuantitativa podría presentar mayor interés), el número de etoxímeros que es posible distinguir por inyección de NP10EO (aunque no estén completamente resueltos), la relación señal/ruido para el NP (relacionado con la cuantificación de los metabolitos lipofílicos) y el tiempo de migración del NP1EC (relacionado con el tiempo total de análisis, y elegido por ser el analito con menor movilidad hacia el cátodo). En cuanto al estudio de los mecanismos involucrados en la separación, todos los demás datos extraíbles y calculables a partir de los electroferogramas bajo las diversas condiciones experimentales (tiempos de migración de todos los analitos y estándares, tiempo de migración del flujo electro-osmótico y sus respectivas movilidades) serían de utilidad en la construcción de gráficos y el establecimiento de relaciones.

Los efectos de cada variable  $x_i$  ( $Ex_i$ ) en la respuesta  $y$  se calculan de la siguiente forma:

$$Ex_i = 1 / 2 * [\Sigma y(+)-\Sigma y(-)] / N_{exp} \quad \text{Ec. (11)}$$

donde  $\Sigma y(+)$  y  $\Sigma y(-)$  son la suma de los valores de la respuesta y en los experimentos en que la variable  $x_i$  toma el valor máximo (*nivel +*) y mínimo (*nivel -*), respectivamente.

El diseño (para 11 factores y 12 experimentos) se construiría así: la primera línea (es decir, el primer experimento) estaría dado por la siguiente combinación de niveles para las diferentes variables: + + - + + + - - - + -, y los experimentos 2 a 11 se obtendrían por permutación cíclica de esta línea; el último experimento (el número 12) contendría sólo signos menos (todas las variables toman el valor mínimo). Sin embargo, cuando el número de factores investigados es menor que el máximo que permite el diseño, existe la posibilidad de agregar factores sustitutos (*dummy factors*). Aunque los únicos efectos reales serán los causados por las variables reales, también se pueden computar los efectos de las variables sustitutas y calcular así la varianza de los efectos ( $S^2_{effect}$ ), que dependerá del número de factores sustitutos ( $n_{dummies}$ ):

$$S^2_{effect} = \Sigma E_{dummies}^2 / n_{dummies} \quad \text{Ec. (12)}$$

donde  $\Sigma E_{dummies}$  es la suma de los efectos de las variables sustitutas, calculados según la Ec. (11).

Luego se calcula el *error crítico* ( $E_{crit}$ ) como:

$$E_{crit} = t_{(\alpha,n)} * S_{effect} \quad \text{Ec. (13)}$$

donde  $t_{(\alpha,n)}$  es el estadístico *t* de Student, para un grado de confianza  $\alpha$  y  $n_{dummies}$  grados de libertad.

Finalmente, la estimación del significado estadístico de los efectos de las variables experimentales se realiza con el siguiente criterio: sólo las variables cuyos efectos sean mayores (en valor absoluto) que  $E_{crit}$  serán consideradas significativas.

En nuestro caso, la combinación de los 11 factores en 16 experimentos daría un número de 4 factores sustitutos para el cálculo de  $S_{effect}$ , lo que permitiría estimar el significado estadístico de los efectos de la forma indicada más arriba con buena precisión, manteniéndose la condición de un número pequeño de experimentos. Por eso, se decidió llevar a cabo el diseño de 16 experimentos, cuyo patrón se presenta en la Tabla 2. El orden de los experimentos está determinado de forma aleatoria [Plackett y Burman, 1946] a partir de las corridas obtenidas por permutación cíclica de la línea: - - - + - - + + - + - + + + +



**Tabla 2**

<b>Factor</b>	<b>A B C D E F G H J K L M N O P</b>
<b>Experimento</b>	
<b>1</b>	- + + + + - - - + - - + + - +
<b>2</b>	+ - + - + + + + - - - + - - +
<b>3</b>	- + - - + + - + - + + + + - -
<b>4</b>	- - - + - - + + - + - + + + +
<b>5</b>	+ - - - + - - + + - + - + + +
<b>6</b>	- + - + + + + - - - + - - + +
<b>7</b>	+ + - + - + + + + - - - + - -
<b>8</b>	- - + + - + - + + + + - - - +
<b>9</b>	+ - + + + + - - - + - - + + -
<b>10</b>	+ + + - - - + - - + + - + - +
<b>11</b>	- - - - - - - - - - - - - - -
<b>12</b>	+ - - + + - + - + + + + - - -
<b>13</b>	- + + - + - + + + + - - - + -
<b>14</b>	+ + + + - - - + - - + + - + -
<b>15</b>	+ + - - - + - - + + - + - + +
<b>16</b>	- - + - - + + - + - + + + + -

A, C-F, H, J, L-O: las variables de la Tabla 1 (1, 2-5, 6, 7, 8-11, respectivamente). B, G, K, P: factores sustitutos.

La siguiente tabla (Tabla 3) muestra la secuencia de experimentos con las diferentes combinaciones de valores asignados a las variables experimentales (las unidades son las mismas que en la Tabla 1).

**Tabla 3**

Experimento	Electrolito soporte				Muestra				Instrumento		
	[SDS]	[ACN]	[fosfato]	pH	[SDS]	[ACN]	[fosfato]	pH	V	T	t iny
1	20	50	10	8	20	20	10	6	10	30	2
2	70	50	5	8	70	50	1	6	10	20	2
3	20	20	5	8	70	50	1	8	10	30	2
4	20	20	10	6	20	50	1	6	10	30	5
5	70	20	5	8	20	50	10	8	5	30	5
6	20	20	10	8	70	20	1	8	5	20	5
7	70	20	10	6	70	50	10	6	5	30	2
8	20	50	10	6	70	50	10	8	5	20	2
9	70	50	10	8	70	20	1	6	5	30	5
10	70	50	5	6	20	20	1	8	5	30	2
11	20	20	5	6	20	20	1	6	5	20	2
12	70	20	10	8	20	20	10	8	10	20	2
13	20	50	5	8	20	50	10	6	5	20	5
14	70	50	10	6	20	50	1	8	10	20	5
15	70	20	5	6	70	20	10	6	10	20	5
16	20	50	5	6	70	20	10	8	10	30	5

Lamentablemente, cuando se habían realizado los primeros cuatro experimentos y a pesar de la información valiosa acerca del comportamiento del sistema que se estaba obteniendo, se decidió interrumpir la tarea planificada. Dicha interrupción se debió a un problema instrumental que había surgido ya en la etapa anterior y que dio evidencia de no haber sido superado. Los capilares de sílice fundida están cubiertos normalmente con una capa de poli-imida, la cual les confiere flexibilidad y los protege de roturas. Por otra parte, en nuestro equipo los extremos del capilar se colocan concéntricamente dentro de los electrodos cilíndricos formando una *aguja capilar*. Encontramos un problema severo de inestabilidad de la cobertura polimérica del capilar,

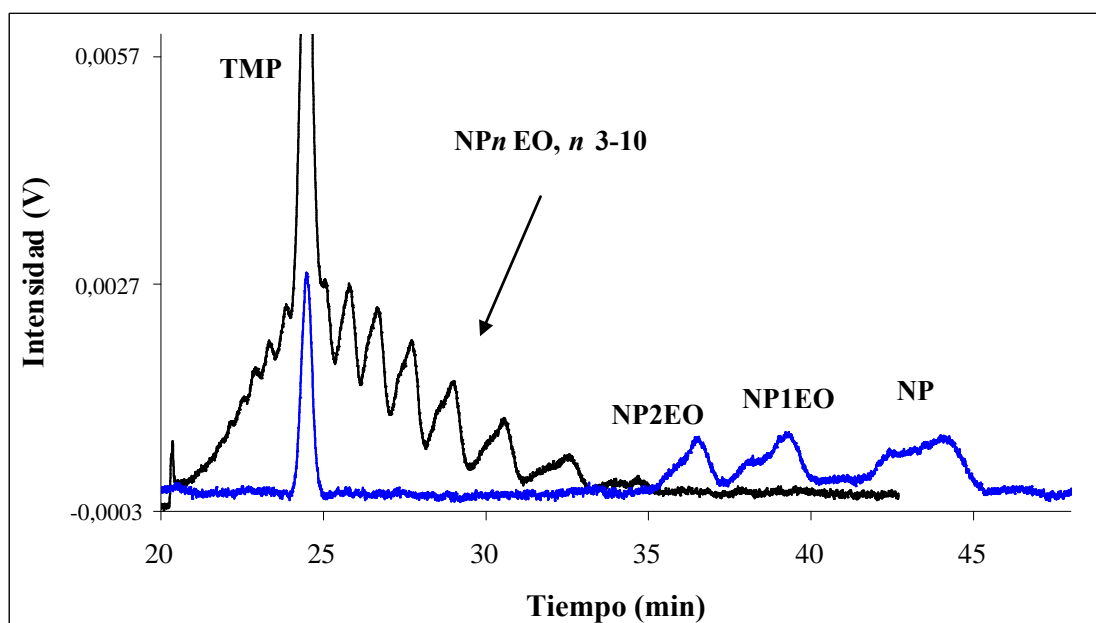
presumiblemente causada por la naturaleza química del BGE utilizado (el cual era una mezcla con altos contenidos de agua, solvente orgánico y tensioactivo) y exacerbada por el arreglo instrumental, la cual hacía que el capilar quedara descubierto (desnudo) en 2-3 jornadas de trabajo. Como consecuencia, la corriente se tornaba errática y el BGE alcanzaba las lentes esféricas de la óptica de detección, que están en contacto directo con la ventana del capilar a través de un arreglo especial del cassette, provocando problemas también en la detección. Seifar y col. [Seifar *et al.*, 1997] habían encontrado un inconveniente de similares características al trabajar con electrolitos conteniendo SDS en mezclas agua-ACN, y pudieron solucionarlo removiendo de antemano aproximadamente 2 cm de la cobertura del capilar. En nuestro caso, sin embargo, el hecho de quemar de antemano la cobertura polimérica de la sección del capilar que se sumerge en el vial con electrolito no previno su ataque (evidentemente, el BGE alcanzaba la zona de poli-imida a pesar de estar muy por encima de la solución). Otras alternativas, como probar diferentes secuencias de lavado entre corridas, o el re-sellado del sello de silicona del cassette con un pegamento especial para evitar que el líquido ascendiera hasta las lentes, tampoco contribuyeron a paliar el problema. Para mantener una buena reproducibilidad, debía armarse un capilar nuevo cada vez que la cobertura comenzaba a despegarse y, si bien con la práctica adquirida el armado de un nuevo capilar podía realizarse en 1-2 horas, los gastos generados eran superiores a los que se podía afrontar en ese momento (aprox. U\$S 16 / capilar, U\$S 130 / mes).

Si bien no pudo completarse el diseño propuesto, pudieron extraerse algunas observaciones cualitativas importantes (no se calcularon los efectos de las variables, ya que el número de experimentos realizado fue muy limitado):

Tanto en las corridas del experimento 1 como en las del experimento 2 (ver condiciones en Tabla 3), el TMP, los NP $n$ EO y el NP migraron como compuestos cargados negativamente; el NP1EC y el BPA aparecieron a tiempos muy largos en el exp. 1, indicando una movilidad muy grande hacia el ánodo, mientras que en el exp. 2 no fueron detectados en 120 min de corrida, lo que indicaría una velocidad de contra-migración aún mayor. En las condiciones del exp. 1 (baja concentración de SDS tanto en el BGE como en la muestra), NP $n$ EO y NP salieron a tiempos cortos e irresueltos. En las condiciones del exp. 2 (altas concentraciones de SDS en BGE y muestra), la resolución de oligómeros de NP $n$ EO y NP fue muy buena. La tendencia encontrada para la resolución de oligómeros coincide con la hallada por Heinig y col. [Heinig *et al.*, 1997] para concentraciones crecientes de SDS en el electrolito soporte. En las corridas de los exp. 3 y 4 (donde la concentración de ACN en el BGE era baja), el TMP no migró como anión sino como compuesto neutro, a la velocidad del EOF, seguido por BPA y NP1EC que salieron a tiempos mayores, bien

resueltos; los oligómeros de NP $n$ EO y NP migraron, irresueltos, a velocidades de contra-migración superiores.

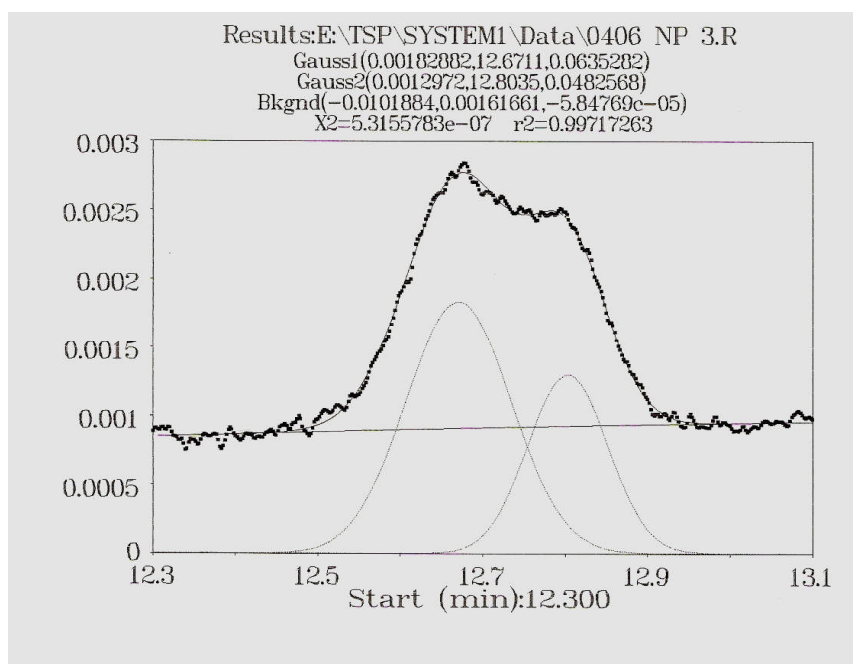
Además, vale la pena destacar que en las condiciones del experimento 2 (concentraciones altas de SDS en BGE y muestra) se observó un desdoblamiento significativo de los picos de los homólogos etoxilados de NP $n$ EO y del NP. En la Figura 12 se muestran electroferogramas obtenidos en dichas condiciones. Un hecho similar puede detectarse para esos mismos compuestos, y también para el NP1EC (muy especialmente), en las condiciones de las Figuras 8 y 9.



**Figura 12:** Electroferogramas superpuestos de una mezcla de NP10EO 500 mg/l y TMP 15 mg/l (trazo negro) y una mezcla de NP 20 mg/l, NP1EO 15 mg/l, NP2EO 15 mg/l y TMP 10 mg/l (trazo azul), ambas en buffer fosfato (de sodio y potasio) 1 mM (pH 6,0), acetonitrilo 50%, SDS 70 mM. BGE: SDS 70 mM, acetonitrilo 50%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM, pH 8. Condiciones instrumentales: V = 10 kV, T = 20 °C; tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,0 s; longitud de onda de detección = 200 nm.

Los productos técnicos son mezclas de isómeros y oligómeros; entre las formas isoméricas, se encuentra un 85-90% de la *para*-sustituida y un 10-15% de la *orto*-sustituida y, para cada una de estas dos clases de isómeros de posición, existe una mezcla de no menos de 16 isómeros ramificados de la cadena alquílica [Thiele *et al.*, 1997]. En la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos por deconvolución del mencionado pico de NP1EC, utilizando un software de deconvolución estándar (*Peak-Fit*). El doble pico proviene, aparentemente, del solapamiento de dos

picos gaussianos de áreas comparables. Esto sugiere la separación parcial de dos grupos de compuestos isoméricos que, por la relación de áreas obtenida, podrían atribuirse a dos sub-grupos de isómeros ramificados del isómero de posición mayoritario (el ácido *para*-nonilfenoxiacético). Tanto en las condiciones del experimento 2 para los etoxímeros, como en las condiciones iniciales para NP1EC, los tiempos de separación largos permitieron que la resolución parcial de compuestos con estructuras tan similares se hiciera visible.



**Figura 13:** Deconvolución del pico de NP1EC 20 mg/l en dos curvas gaussianas. Las condiciones experimentales son las de la Figura 9.

Se intentó entonces encontrar una composición de BGE que permitiera obtener un buen rendimiento analítico -basándonos en el mismo principio de asociación solvofóbica- pero que además proporcionara un tiempo de vida mayor para el capilar. Como primera medida se decidió cambiar el solvente orgánico, seleccionando entre los citados en la literatura [Heinig *et al.*, 1997] uno que es en general menos agresivo que el ACN para los polímeros, el 2-Propanol [Millipore, 2000]. Dado que de las cuatro condiciones del diseño P-B ensayadas con ACN ninguna superaba en resultados a las primeras condiciones evaluadas (BGE: SDS 49 mM, 40 % ACN y fosfato 10 mM - pH 6,8), se decidió utilizar en principio esas mismas condiciones pero reemplazando al ACN por 2-Propanol. La separación obtenida con el nuevo BGE fue muy buena, aunque los tiempos de análisis resultaron mayores, como era de esperar por la mayor viscosidad y la constante dieléctrica menor

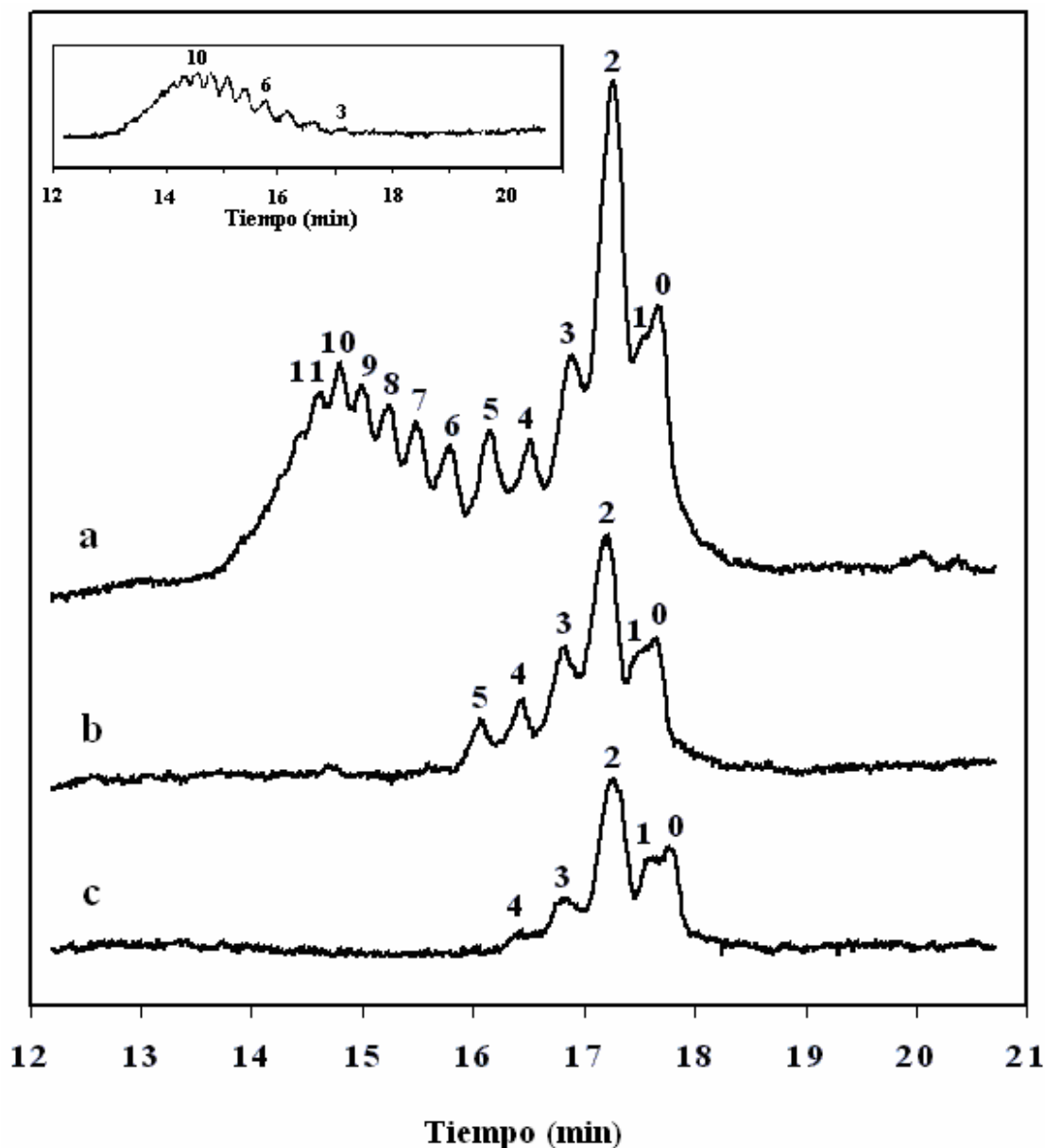
del 2-PrOH con respecto al ACN ( $\eta = 2,83$  y  $0,40$  mPa s,  $\epsilon_r = 21,0$  y  $38,0$  para 2-PrOH y ACN, respectivamente) [Lide (Ed.), 1998-1999].

### 3.1.2.d. Aplicación en el seguimiento de la degradación de NP10EO en reactores SCAS

El nuevo método se utilizó para continuar el trabajo de colaboración con los grupos de INGEBI-INTI, participando en una investigación sobre el efecto de los NP $n$ EO en la diversidad bacteriana de reactores SCAS (*Semi-Continuous Activated Sludge*). Se trata de plantas de tratamiento de efluentes a escala de laboratorio, que consisten en reactores biológicos individuales de 3 litros con un inóculo denominado *barro activado*, proveniente de la cámara de aireación de la planta de tratamiento de efluentes de un centro comercial situado de la ciudad de Castelar, Pcia. de Bs. As. Los reactores (dos *tratamientos* y dos *controles*) están operados bajo un régimen semi-continuo de alimentación; se introduce aire a un caudal de 1,3 l/min y como fuente de carbono se utiliza un medio rico que simula la carga orgánica de un líquido cloacal (dilución de un concentrado de 32 g/l peptona, 22 g/l extracto de levadura, 6 g/l urea, 1,8 g/l NaCl, 0,8 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,4 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 55,6 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 16 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), con el cual se alimenta los reactores día por medio. Sesenta minutos antes de la alimentación se interrumpe el flujo de aire y, al detenerse la agitación, se produce una decantación de la biomasa quedando un sobrenadante límpido (el *efluente tratado*) que se descarta por medio de bombas peristálticas. A los reactores de *tratamiento* se les agrega además NP10EO en una concentración final de 60 mg/l.

La comprensión de los aspectos microbiológicos involucrados en el metabolismo de los NP $n$ EO es esencial para el establecimiento de las condiciones ambientales necesarias para alcanzar la mineralización completa de estos compuestos utilizando sistemas de tratamiento biológico. Dado que la abundancia de los distintos metabolitos presentes en sistemas naturales y en efluentes de plantas de tratamiento es muy dependiente de las vías de degradación involucradas [Ahel *et al.*, 1994-*a*; Potter *et al.*, 1999], resultaba fundamental en este estudio el seguimiento analítico del proceso y la identificación de los productos formados. Para ello, se tomaron muestras de 250 ml del *efluente tratado* y se las extrajo sobre una fase sólida de C-18. El eluato (1,2 ml de ACN) se introdujo en el capilar luego de su dilución en buffer fosfato hasta alcanzar una concentración de

40% ACN. En la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos; el recuadro en el extremo superior izquierdo muestra el electroferograma de una solución estándar de NP10EO 500 mg/l, con el objeto de poder apreciar la distribución de oligómeros antes de la degradación.



**Figura 13:** Electroferogramas de los eluatos de C-18 de los sobrenadantes de SCAS a diferentes tiempos luego de la alimentación con NP10EO: (a) 30 minutos, (b) 3 horas y (c) 48 horas. Los números sobre los picos indican el número de unidades etoxilo en la molécula correspondiente. BGE: SDS 49 mM, 2-Propanol 40%, en buffer fosfato (de sodio y potasio) 10 mM, pH 6,8. Muestras: en buffer fosfato (de sodio y potasio) 5 mM (pH 6,8), acetonitrilo 40%. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 25 °C; tiempo de inyección hidrodinámica (a 0,8 psi) = 2,5 s; longitud de onda de detección = 200 nm.

La aclimatación de los barros al tensioactivo fue confirmada por la rápida desaparición de espuma, y el rendimiento de los reactores en cuanto a la remoción de carbono orgánico no se vio afectado por la presencia del detergente en la solución de alimentación. Tal como puede apreciarse en la Figura 13, el NP10EO sufrió una rápida degradación primaria con un cambio en la distribución de oligómeros, resultando en un aumento transitorio de los oligómeros de cadena media y un aumento notable en la concentración de los oligómeros de cadena corta, incluyendo NP (Figura 13-a). Luego de 3 horas de tratamiento (Figura 13-b) los etoxímeros de cadena más larga ( $n = 6-12$ ) ya no fueron detectables, y el patrón de oligómeros de cadena corta no sufrió alteraciones apreciables en las siguientes 45 horas (Figura 13-c). El nonilfenol di-etoxilado resultó el metabolito primario mayoritario, seguido por NP3EO, NP1EO y NP como metabolitos minoritarios. El metabolito ácido (NP1EC) no fue producido en niveles detectables. En cuanto a la composición de la comunidad bacteriana, los reactores alimentados con NP10EO mostraron una alta proporción de miembros de la familia *Betaproteobacteria*, sugiriendo que dicho grupo podría tener un rol específico en la degradación de esta clase de tensioactivos.

El cambio realizado en la composición del BGE logró aumentar el tiempo de vida del capilar a aproximadamente el doble y el método en su presente forma presentó una buena aptitud para el seguimiento de los procesos de degradación de los NP $n$ EO. Se decidió entonces dar por finalizada la investigación de las separaciones en medio hidro-orgánico a través de la explotación de interacciones lipofílicas entre los analitos y el aditivo aniónico, y se comenzó el estudio de las separaciones en solventes no-acuosos.

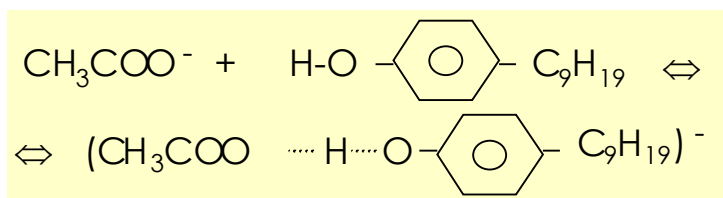
### **3.2. MEDIO NO ACUOSO**

Tal como ha sido discutido por Bowser y colaboradores [Bowser *et al.*, 1998], la elección adecuada de solventes orgánicos ofrece la posibilidad de separaciones electroforéticas basadas en interacciones que no pueden ocurrir o que apenas pueden ser detectadas en solventes acuosos.

Por ejemplo, ácidos de Brønsted no disociados (fenoles, ácidos carboxílicos y alcoholes) han sido separados en acetonitrilo, haciendo uso de su hetero-asociación con aniones pequeños como  $\text{Cl}^-$ ,

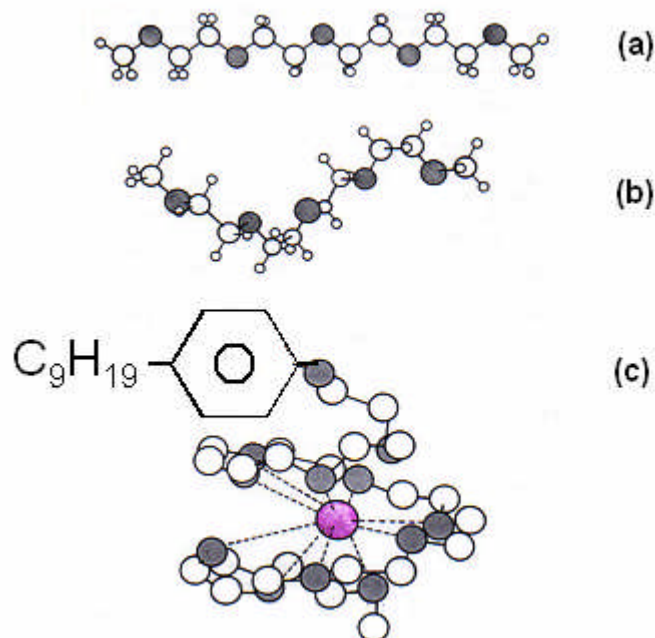


$\text{ClO}_4^-$  y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  ( $\text{Ac}^-$ ). Debido a la baja habilidad de este solvente aprótico como aceptor de electrones (o formador de puentes de hidrógeno), dichos aniones experimentan una solvatación muy débil e interactúan preferentemente con donores de hidrógeno más fuertes, como los ácidos de Brønsted, dando origen a la formación de aniones hetero-conjugados [Okada, 1997; Okada, 1998; Riekkola *et al.*, 2000; Porras *et al.*, 2003;]. En la Figura 14 se representa el equilibrio de formación de un anión hetero-conjugado entre el  $\text{Ac}^-$  y el nonilfenol no disociado.



**Figura 14:** Esquematación de la formación de un anión hetero-conjugado entre  $\text{Ac}^-$  y nonilfenol

Por otra parte, Okada [Okada, 1990; Okada, 1993] ha mostrado que los poli(oxietilenos) (POE) son capaces de formar esferas de coordinación a la distancia óptima requerida por determinados cationes, frecuentemente atrapándolos en una estructura de hélice, tal como se representa en la Figura 15.



**Figura 15:** Ilustración de: (a) forma extendida de una molécula de dimetil-polietilenglicol, (b) forma helicoidal de la misma molécula y (c) un complejo entre NPnEO y un ion metálico. Los

átomos de carbono se representan con esferas blancas grandes, los de hidrógeno con pequeñas, los de oxígeno con esferas grises y el ion metálico con una esfera rosa.

La ocurrencia de este tipo de complejación no se verá favorecida en un solvente como el agua, el cual tiene una gran habilidad para solvatar cationes duros. En ese caso, los poliéteres son incapaces de reemplazar las moléculas de agua existentes en la atmósfera de coordinación del catión. En metanol, en cambio, Okada [Okada, 1995] ha llevado a cabo la separación electrofrética de una variedad de POE, basándose en la complejación de los analitos no iónicos con cationes tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ , permitiendo así la migración de las moléculas neutras hacia el cátodo.

En esta parte del trabajo de tesis se exploró el uso de varios solventes y mezclas de solventes, así como el efecto de diferentes medios de inyección, concentraciones de electrolito y dos modos de detección (UV simple y con arreglo de diodos), en la separación e identificación de  $\text{NP}_n\text{EO}$  y los metabolitos lipofílicos  $\text{NP}_2\text{EO}$ ,  $\text{NP}_1\text{EO}$  y  $\text{NP}$ . Para ello, se explotó la interacción con  $\text{NaAc}$  en medios no acuosos. Basándonos en la complejación con  $\text{Na}^+$ , se investigó la separación de  $\text{NP}_n\text{EO}$  con 3 ó más grupos etoxilo, mientras que para la separación de  $\text{NP}_2\text{EO}$ ,  $\text{NP}_1\text{EO}$  y  $\text{NP}$  se consideró la hetero-conjugación con  $\text{Ac}^-$ .

### **3.2.1. DETECCIÓN ESPECTROMÉTRICA EN EL ULTRAVIOLETA**

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción en el UV de los oligómeros de cadena corta y larga de  $\text{NP}_{10}\text{EO}$  disueltos en un BGE de  $\text{NaAc}$  12,5 mM en una mezcla  $\text{ACN} / \text{MeOH} / \text{HAc}$  88:10:2 (en volumen). Todos ellos presentaron máxima intensidad de absorción alrededor de los 200 nm, y máximos relativos alrededor 230 y 277 nm.

Se decidió, en consecuencia, realizar la detección simultánea a 195, 200 y 205 nm con el equipo ThermoSeparation, y a 196 y 200 nm con el equipo Beckman. La mayor relación señal ruido fue obtenida a 195 y 196 nm, con cada instrumento respectivamente. Con el equipo Beckman, se llevó a cabo simultáneamente la detección a longitudes de onda múltiples en el intervalo 190-300 nm, utilizando el detector de arreglo de diodos (DAD). Los espectros de absorción característicos de los

analitos, con máximos alrededor de 200, 230 y 277 nm, permitieron discriminarlos de otras señales e identificarlos positivamente en zonas de poca resolución de los electroferogramas.

### 3.2.2. EFECTOS DEL SOLVENTE DEL ELECTROLITO SOPORTE

Las propiedades físico-químicas más relevantes para este estudio, correspondientes a los solventes orgánicos investigados (y también las del agua), se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Solvente	$\eta$ (mPa s) <sup>1</sup>	$\epsilon_r$ <sup>1</sup>	pKa <sup>2</sup>	t <sub>eb</sub> (°C)	DN (kcal mol <sup>-1</sup> )	AN
Agua	1,19	82,0	14	100	33	54,8
Metanol	0,62	34,3	17,2	64,7	30	41,3
Etanol	1,29	26,3	18,9	78,3	32	37,1
1-Propanol	2,42	22,1	19,43	97,2	n.d.	n.d.
2-Propanol	2,83	21,0	20,8	82,3	36	33,5
1-Butanol	3,25	18,7	21,56	117,7	30	36,8
Acetonitrilo	0,40	38,0	> 33,3	82	14,1	19,3
Tetrahidrofurano	0,51	7,7	----	66	20	8

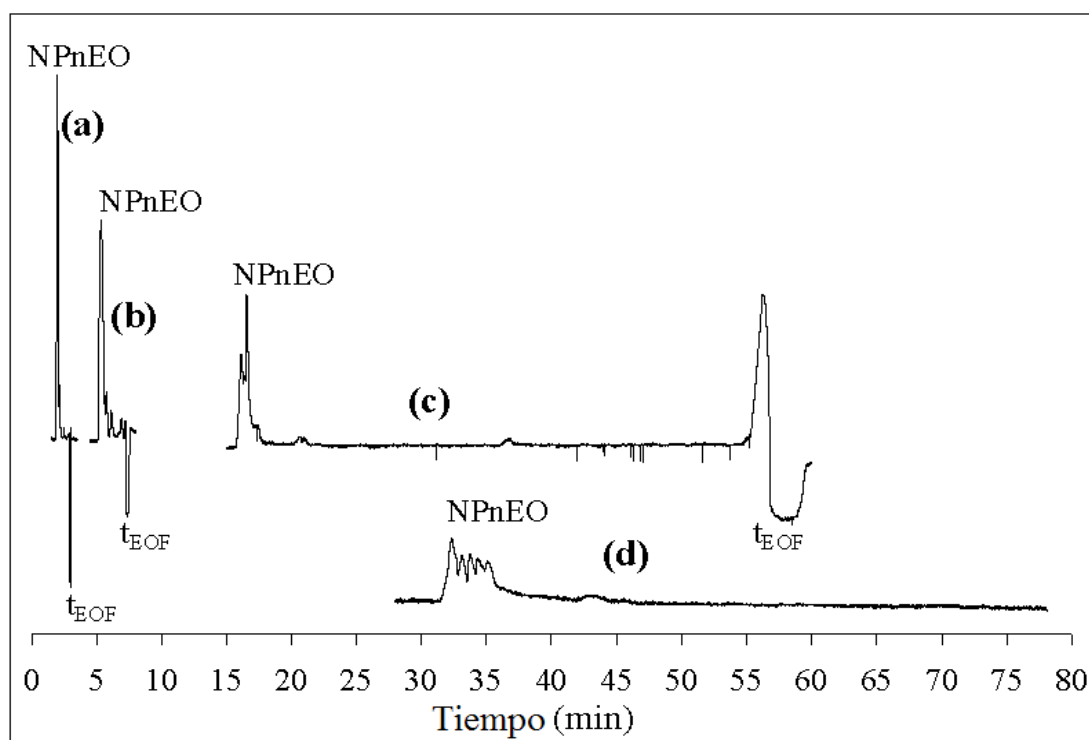
$\eta$  = coeficiente de viscosidad,  $\epsilon_r$  = constante dieléctrica, pKa = logaritmo negativo de la constante de autoprotólisis, t<sub>eb</sub> = temperatura de ebullición, DN = donicidad del solvente (“*solvent donicity*”), AN = número de aceptor del solvente (“*solvent acceptor number*”)

DN y AN según definición de Gutmann [Gutmann, 1976]. Valores de  $\eta$  y  $\epsilon_r$  tomados de [Lide (Ed.), 1998-1999]. Valores de pKa y t<sub>eb</sub> tomados de [Riekkola *et al.*, 2000]. Valores de DN y AN tomados de [Bowser *et al.*, 1998; Gutmann, 1976; Geiser *et al.*, 2005]. n.d.: dato no disponible.

<sup>1</sup> Valores a 15 °C, <sup>2</sup> Valores a 25 °C,

### 3.2.2.a. Respuesta del flujo electrosmótico

Utilizando NP10EO como analito, se evaluaron las respuestas electroforética y electrosmótica para composiciones de BGE consistentes en NaAc 12,5 mM y HAc 2% (v/v) disueltos en ACN, MeOH, etanol (EtOH), 1-propanol (1-PrOH) y tetrahidrofurano (THF). Se empleó el equipo ThermoSeparation en esta parte del trabajo. La Figura 16 muestra electroferogramas registrados por inyección de 660 mg/l de NP10EO en ACN, MeOH, EtOH y 1-PrOH, respectivamente. Como puede observarse, en todos los casos los oligómeros de NP $n$ EO migraron como cationes, con velocidades aparentes mayores que la del EOF, indicando la viabilidad de la complejación con Na<sup>+</sup>.



**Figura 16:** Electroferogramas de NP10EO 660 mg/l en el solvente del BGE correspondiente. BGE's: NaAc 12,5 mM (2% HAc) en (a) 100% ACN, (b) 100% MeOH, (c) 100% EtOH, (d) 100% 1-PrOH. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda de detección = 195 nm, tiempo de inyección (a 0,8 psi) = 2,5 s. Las zonas atribuidas a los analitos (NP $n$ EO) y al flujo electrosmótico (EOF) están indicadas para cada BGE. En las Figuras 3 (a) y 3 (d) se muestran versiones expandidas de los electroferogramas (a) y (b) de esta figura.

Cuando se utilizaron los electrolitos en ACN y MeOH los tiempos de análisis resultaron considerablemente cortos (menores que 8 minutos). En el caso del EtOH la separación de etoxilatos superiores mejoró, pero un tiempo de migración del flujo electro-osmótico de 57,9 minutos resultaría inaceptablemente largo para un análisis práctico. Una separación aún mejor de los homólogos superiores se observó al trabajar con 1-PrOH, pero el marcador del flujo electro-osmótico (la acetona) no fue detectado aún después de 80 minutos de corrida. En cuanto al BGE en THF, ni el marcador del flujo electro-osmótico ni los analitos fueron detectados incluso después de 100 minutos de electroforesis.

Los parámetros físico-químicos que influyen en el EOF son la constante dieléctrica ( $\epsilon_r$ ) y la viscosidad ( $\eta$ ) del medio, y el potencial electrocinético o potencial zeta ( $\zeta$ ). Estos parámetros están relacionados con la movilidad electro-osmótica a través de la ecuación de Von Smoluchowski [Grossman y Colburn (Eds.), 1992]:

$$\mu_{eo} = - \epsilon_0 \epsilon_r \zeta / \eta \quad \text{Ec. (14)}$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío.

El potencial zeta puede ser descripto como [Foret *et al.*, 1993]:

$$\zeta = \sigma_0 (\epsilon_0 \epsilon_r K)^{-1} \quad \text{Ec. (15)}$$

donde  $\sigma_0$  es la densidad de carga (negativa) sobre la superficie de la pared del capilar y  $K$  se refiere al espesor de la doble capa.

Introduciendo los parámetros que determinan el potencial zeta,  $\mu_{eo}$  resulta:

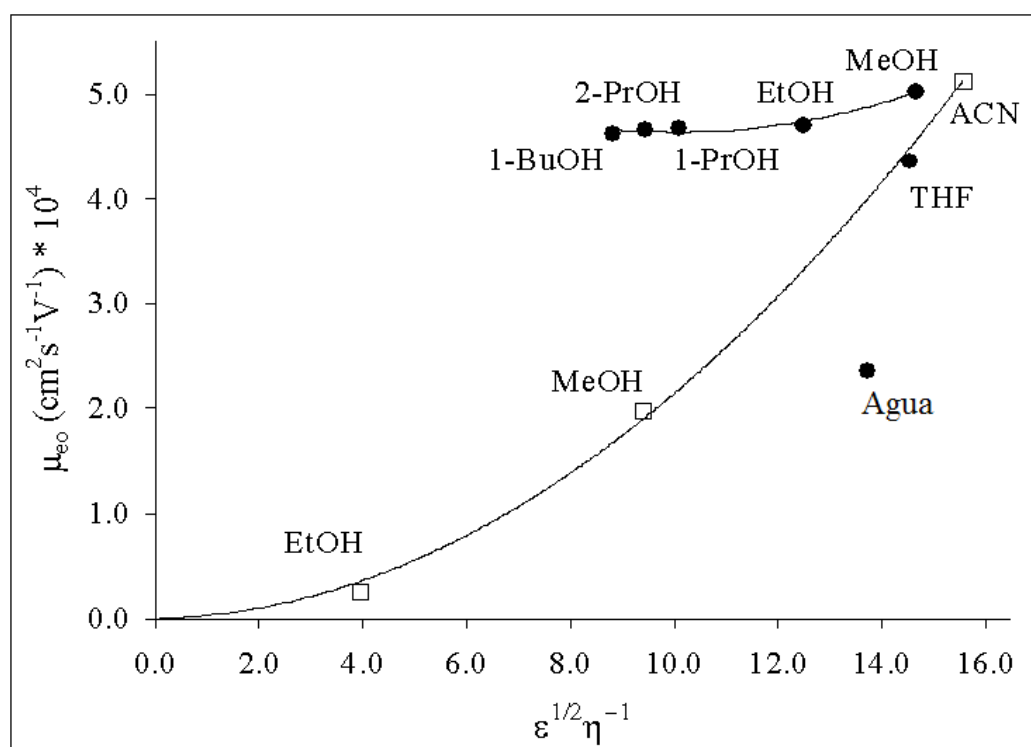
$$\mu_{eo} = -(\epsilon_r^{1/2} / \eta) \sigma_0 I^{-1/2} (\epsilon_0 RT / 2000F^2)^{1/2} \quad \text{Ec. (16)}$$

donde  $I$  es la fuerza iónica de la solución,  $R$  y  $F$  son las constantes del gas ideal y de Faraday, respectivamente, y  $T$  es la temperatura absoluta.

Un análisis de la Ec. (16) permite una estimación cualitativa de la influencia de las diferentes variables sobre la movilidad electro-osmótica. A temperatura constante, las desviaciones de una línea recta con ordenada al origen cero en un gráfico de  $\mu_{eo}$  vs.  $\epsilon_r^{1/2} / \eta$  para distintos solventes y sus

mezclas, evidenciará la dependencia del factor  $\sigma_0 I^{-1/2}$  con la variación en la constante dieléctrica y la habilidad como donores y aceptores de los medios estudiados [Salimi-Moosavi y Cassidy, 1996; Schwer y Kenndler, 1991].

En la Figura 17 se presentan gráficos obtenidos a partir de mediciones de  $\mu_{eo}$  para electrolitos soporte en solventes puros y mezclas, conteniendo en todos los casos NaAc 12,5 mM y 2% HAC.



**Figura 17:** Movilidades electro-osmóticas para diferentes solventes y mezclas de solventes, como función de  $\epsilon^{1/2}/\eta$ . BGE'S: NaAc 12,5 mM (2% HAC) en: 100% ACN, MeOH y EtOH (cuadrados), y 10% de MeOH, EtOH, 1-PrOH, 2-PrOH, 1-BuOH, THF y agua en ACN (círculos llenos). Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda de detección = 195 nm, tiempo de inyección (a 0,8 psi) = 2,5 s.

Los puntos experimentales de la figura corresponden por un lado a ACN, MeOH y EtOH puros y, por el otro, a los solventes de la Tabla 4 en proporción 10% v/v en ACN. Para las mezclas de solventes, se estimaron los valores de viscosidad y constante dieléctrica a partir de las propiedades individuales de cada componente, asumiendo una variación proporcional a la composición de la mezcla [Schwer y Kenndler, 1991]. Si bien las respuestas son diferentes para cada conjunto de puntos (solventes puros y mezclas, respectivamente), se observa en ambos casos una tendencia

(salvo excepciones en el caso de las mezclas) al aumento de la movilidad electro-osmótica con  $\varepsilon_r^{1/2}/\eta$  y un comportamiento no lineal.

La desviación de una respuesta lineal en el caso de los solventes puros podría estar reflejando la fuerte influencia del descenso de la fuerza iónica en un medio aprótico como es el ACN. En el caso de las mezclas de los alcoholes con ACN, las movilidades electro-osmóticas resultaron significativamente mayores que para los solventes puros y muy similares a las medidas para el ACN puro. Intentamos explicar este comportamiento examinando la respuesta de 100% MeOH comparada con la solución 10% v/v de 2-PrOH en ACN (ambos BGE's tienen relaciones  $\varepsilon_r^{1/2}/\eta$  similares). Normalmente, se esperaría que la formación de pares iónicos del electrolito causara un aumento en la velocidad electro-osmótica debido a una disminución de la fuerza iónica. Existe evidencia sobre la formación de pares iónicos para sales simples 1:1 disueltas en MeOH, EtOH, ACN y otros solventes [Porras y Kenndler, 2004]. En nuestro caso, las constantes dieléctricas son similares ( $\varepsilon_r$  MeOH = 34,3,  $\varepsilon_r$  2-PrOH/ACN = 36,2), pero la formación de pares iónicos (la cual reduce la fuerza iónica) se vería más favorecida en presencia de 90% ACN debido a las pobres propiedades como donador y aceptor de electrones de este solvente aprótico. Es por esto que las movilidades electro-osmóticas resultan significativamente mayores para un 10% de los distintos solventes en ACN, cuando se los compara con un 100% de solventes próticos, como son los alcoholes.

Por otra parte, el comportamiento de THF puro y 10% en ACN no puede ser explicado considerando solamente los efectos de la fuerza iónica. Tal como se mencionó anteriormente, el marcador del EOF no fue detectado luego de 100 minutos de electroforesis en THF. La constante dieléctrica de este solvente es comparativamente muy baja, y sus capacidades como donador y aceptor son desfavorables para la disociación de electrolitos, apuntando a un aumento de la formación de pares iónicos (es decir, una disminución de la fuerza iónica). Sin embargo la movilidad electro-osmótica disminuyó, sugiriendo entonces una notable reducción en la carga negativa efectiva de la pared interna del capilar ( $\sigma_0$ ). La disminución de la constante de autoprotólisis de los grupos silanol debido a la presencia de un solvente con una constante dieléctrica tan baja causará una disminución en el grado de disociación y, concurrentemente, una reducción en el potencial zeta sobre la superficie de la sílice [Salimi-Moosavi y Cassidy, 1996; Porras y Kenndler, 2004]. En THF, este efecto no puede ser compensado por la mencionada (y esperada) disminución de la fuerza iónica. Además, los iones sodio provenientes del acetato de sodio y contenidos en un BGE "no-disociante" podrían tender a adsorberse extensamente sobre la pared cargada negativamente [Schwer y

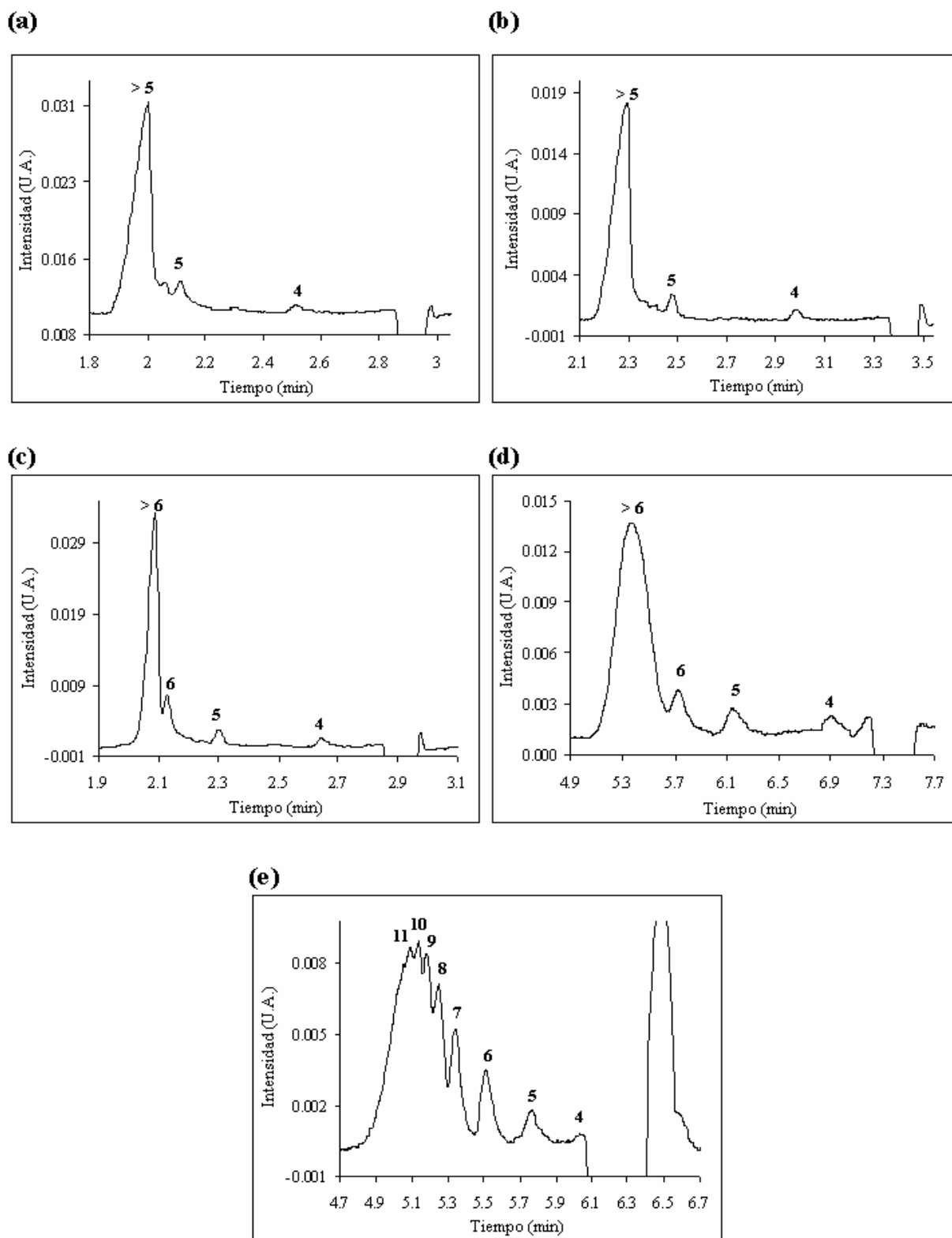
Kenndler, 1991; Salimi-Moosavi y Cassidy, 1995]. Más aún, la ausencia de señal del marcador del EOF en 100 minutos de corrida en el caso del THF puro, podría atribuirse a una inversión del flujo electro-osmótico a causa de una inversión del signo de la carga sobre las paredes del capilar. De hecho, Cottet y col. [Cottet *et al.*, 2001] han reportado un flujo electro-osmótico anódico en mezclas THF-MeOH bajo condiciones fuertemente ácidas. El comportamiento observado en nuestro caso sugiere que la separación de los oligómeros de mayor longitud de cadena etoxilada de NP $n$ EO podría llevarse a cabo con buena resolución utilizando como solvente THF puro e invirtiendo la polaridad de los electrodos. Aunque nosotros no pudimos realizar experimentos en este sentido, Desbène y col. [Desbène *et al.*, 2005] propusieron recientemente la utilización de una inversión del flujo electro-osmótico para la determinación de alcoholes grasos etoxilados derivatizados, utilizando capilares recubiertos cargados positivamente y metanol como solvente del BGE.

En esta serie de experimentos se incluyó el agua (10% v/v en ACN) a efectos comparativos. Su comportamiento respecto de un descenso notable en la movilidad electro-osmótica es consistente con una fuerza iónica mayor (es decir, la supresión de la formación de pares iónicos), lo que produciría una disminución en el espesor de la doble capa sobre las paredes del capilar.

### **3.2.2.b. Resolución de oligómeros**

Las separaciones de oligómeros de NP $n$ EO con  $n > 3$  logradas bajo las condiciones experimentales estudiadas están representadas en la Figura 18 para varias composiciones de BGE (solventes puros y mezclas). En estas corridas no se observaron señales positivas para las moléculas con  $n < 3$  (es decir: NP2EO, NP1EO y NP) ya sea como picos individuales o solapados, sugiriendo que los compuestos lipofílicos migraron a la velocidad del flujo electrosmótico. El pico de NP3EO, migrando más rápido que el EOF, fue apenas discernible en algunos casos.



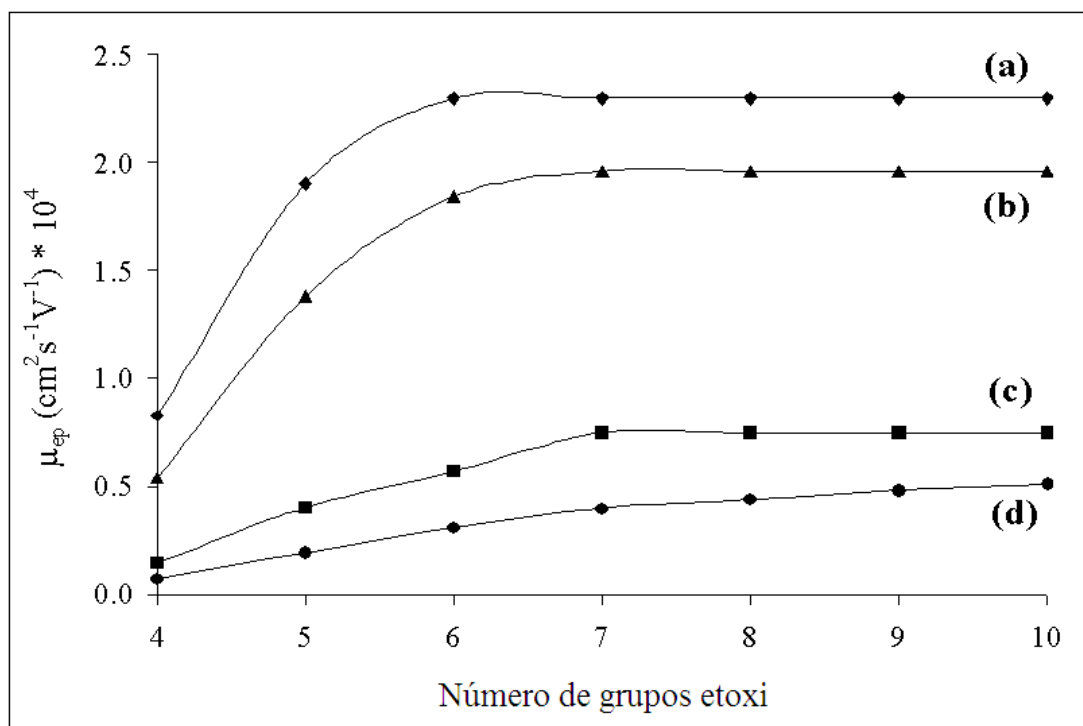


**Figura 18:** Electroferogramas de NP10EO 660 mg/l en el solvente del BGE. BGE's: NaAc 12,5 mM (2% HAc) en (a) 100% ACN, (b) 10% BuOH en ACN, (c) 10% MeOH en ACN, (d) 100% MeOH, (e) 10% agua en ACN. Los números sobre los picos indican el número de grupos etoxilo en el oligómero de NP $n$ EO correspondiente. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda de detección = 195 nm, tiempo de inyección (a 0,8 psi) = 2,5 s.

Tal como se mencionó anteriormente, la presencia de HAc en el electrolito en ACN permitió la disolución del NaAc. Dado que este ácido se comporta como un electrolito muy débil en ACN (tiene un pKa de 22,3 en ese solvente) [Porrás *et al.*, 2003], se esperaba que no contribuyera con una cantidad de H<sup>+</sup> suficiente como para competir con el Na<sup>+</sup> en la formación de complejos catión-poliéter. Ese hecho se verificó corriendo una muestra conteniendo 660 mg/l de NP10EO en ACN, con un BGE consistente en 2% (v/v) HAc en ACN (es decir, sin el agregado de NaAc). Bajo esas condiciones, no se detectó circulación de corriente ni pudieron observarse señales correspondientes a los analitos.

La migración de las moléculas de NP $n$ EO con  $n > 3$  se debe, entonces, a la formación de especies cargadas por complejación con los cationes Na<sup>+</sup> presentes en el BGE. Como consecuencia, las movilidades electroforéticas de las especies catiónicas complejas no dependerán sólo de la carga y del tamaño molecular, sino también del grado de complejación. Los electroferogramas de la Figura 18 muestran que, a pesar de su mayor tamaño molecular, los oligómeros de cadena larga de NP $n$ EO migraron más rápido que los de cadena etoxilada más corta. Dado que las constantes de formación de complejos entre los POE y los cationes crecen sistemáticamente con la longitud de la cadena etoxilada [Okada, 1998], el grado de complejación parece constituir el factor primario en el gobierno de la migración.

En la Figura 19 se presenta un gráfico de movilidad electroforética en función del número de grupos etoxilo en la cadena del oligómero. Cada curva corresponde a diferentes composiciones de BGE's en cuanto a los solventes y sus mezclas. Con 100% ACN, el punto de quiebre (es decir, el número de unidades oxietileno en la molécula más larga que puede ser claramente discriminada) se da para  $n = 5$ , con muy buena selectividad para las cadenas más cortas. De manera similar, se observa buena selectividad para 10% MeOH en ACN, y el compuesto con  $n = 6$  aún puede ser discriminado. Para 100% MeOH resulta un grado de separación más pobre, pero aún pueden observarse las moléculas individuales con  $n = 6$ . Por otra parte, cuando se utiliza un BGE con 10% de agua en ACN como solvente, pueden distinguirse picos con  $n$  hasta aproximadamente 11, sólo que con diferencias muy pequeñas en las movilidades electroforéticas.



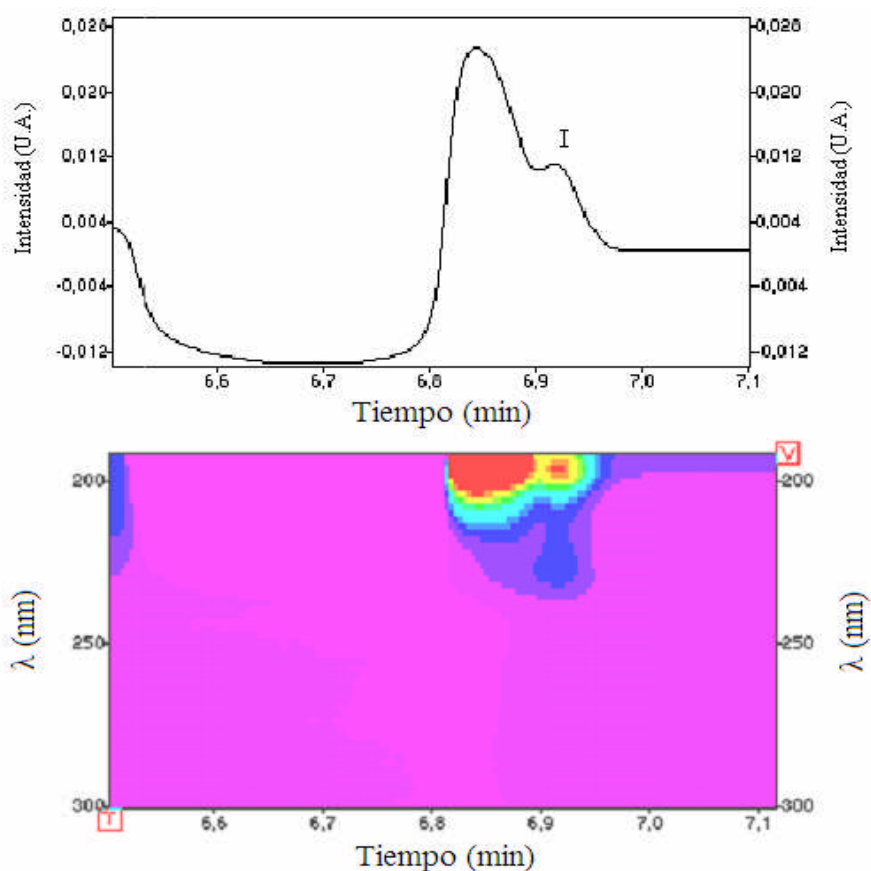
**Figura 19:** Movilidades electroforéticas de los NP $n$ EO en función del número de grupos etoxilo, para diferentes solventes en el BGE. BGE's: NaAc 12,5 mM (2% HAc) en (a) 100% ACN, (b) 10% MeOH en ACN, (c) 100% MeOH, (d) 10% agua en ACN. Muestra: NP10EO 660 mg/l en el solvente del BGE. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda de detección = 195 nm, tiempo de inyección (a 0,8 psi) = 2,5 s.

En términos generales, los valores de  $\mu_{ep}$  son más bajos en presencia de metanol (ya sea puro o 10% en ACN) y de agua (10% en ACN). Los átomos de oxígeno de los grupos éter involucrados en la complejación estarán formando parte de la esfera de coordinación del catión y, dado que dicha esfera está en principio ocupada por moléculas de solvente, la formación de uniones de coordinación competirá con la solvatación [Okada, 1998]. Se observó que la adición de agua al electrolito en ACN favoreció la separación de los NP $n$ EO de cadenas más largas, mientras que la resolución empeoró para  $n$  decrecientes. El agua, y en menor grado el metanol, son solventes desfavorables para la formación de complejos poliéter-catión debido a sus excelentes propiedades de solvatación para cationes duros. Por eso, es razonable pensar que los efectos observados están relacionados con el descenso de las constantes de complejación.

### 3.2.3. COMPORTAMIENTO DE LOS METABOLITOS LIPOFÍLICOS

En el BGE conteniendo NaAc y HAc, la habilidad del ácido para formar enlaces puente de hidrógeno con la base conjugada a través de la homo-conjugación, dificultará la hetero-conjugación de NP1EO, N2EO y NP por medio de interacciones hidroxilo-acetato. Con el propósito de investigar la separación de dichas moléculas lipofílicas, se disolvió la sal en ACN sin el agregado de HAc, adicionando en su lugar un 20% de MeOH (vale la pena resaltar que la disolución del NaAc deriva en este caso de la hetero-conjugación entre el ion acetato y el MeOH) [Bowser *et al.*, 1998].

La Figura 20 muestra resultados obtenidos empleando el instrumento Beckman, con un detector de arreglo de diodos. Además del electroferograma convencional (adquisición de la señal en función del tiempo a una longitud de onda fija), se registró un gráfico bidimensional de absorbancia-longitud de onda en función del tiempo.



**Figura 20:** Electroferograma adquirido a longitud de onda simple y múltiple. Muestra: NP 10 mg/l en ACN. BGE: NaAc 12,5 mM en ACN / MeOH (80:20). El I indica el pico de NP. Condiciones

instrumentales:  $V = 15 \text{ kV}$ ,  $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ , longitud de onda simple = 196 nm, tiempo de inyección (a 0,5 psi) = 5,0 s.

De esta manera, se pudo identificar positivamente al NP, apoyándose en el espectro de absorción característico del compuesto en el diagrama bidimensional. La formación de un anión hetero-conjugado entre el NP no disociado y el  $\text{Ac}^-$  en ausencia de HAc, fue demostrada por la separación del compuesto fenólico del pico electro-osmótico. La aparición a un tiempo de migración mayor que el del EOF, confirma que se trata de un compuesto (hetero-conjugado) cargado negativamente. La discriminación de los nonilfenil éteres NP1EO y NP2EO no fue posible bajo las condiciones de la Figura 20; este resultado puede atribuirse a una hetero-conjugación poco favorecida entre el  $\text{Ac}^-$  y los grupos alcohol terminales de dichos analitos, a raíz de la presencia de un alto contenido (20%) de MeOH.

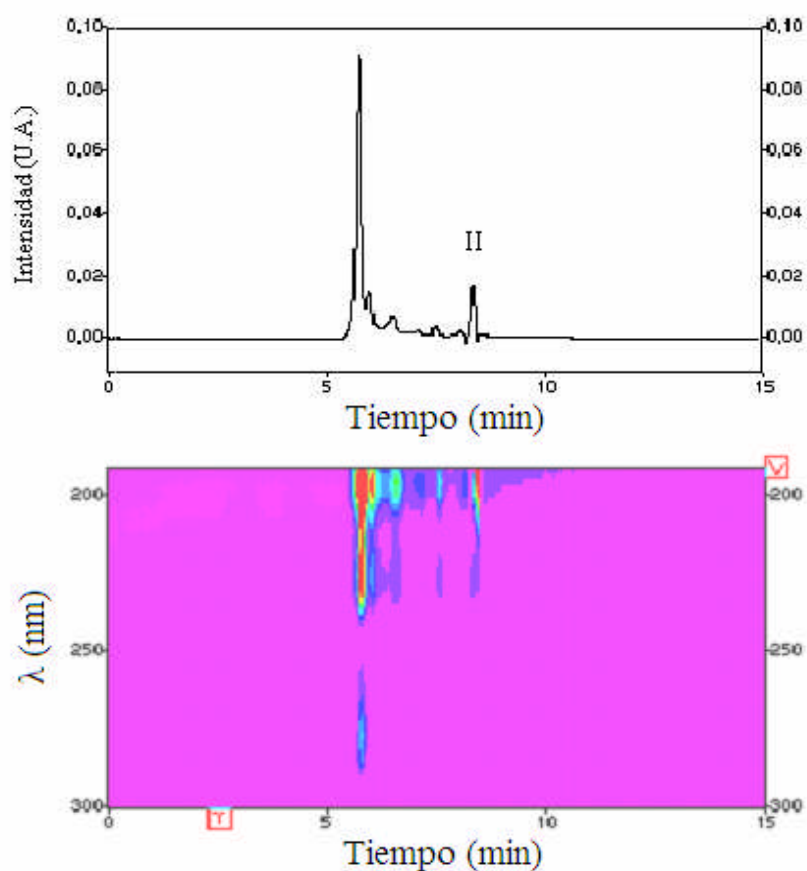
### **3.2.4. INFLUENCIA DEL SOLVENTE DE LA MUESTRA SOBRE LA SELECTIVIDAD**

Durante este estudio, pudimos notar que el solvente empleado en la preparación de la muestra afectaba significativamente la selectividad. Por ejemplo, se encontró que cuando la muestra se disolvía en 1-propanol, la resolución de oligómeros superiores era mejor que cuando la muestra estaba disuelta en MeOH o en ACN. Sin embargo, la discriminación de compuestos lipofílicos en la misma corrida se veía afectada debido a la existencia de señales provenientes del solvente en la zona del electroferograma correspondiente a compuestos con carga neta nula.

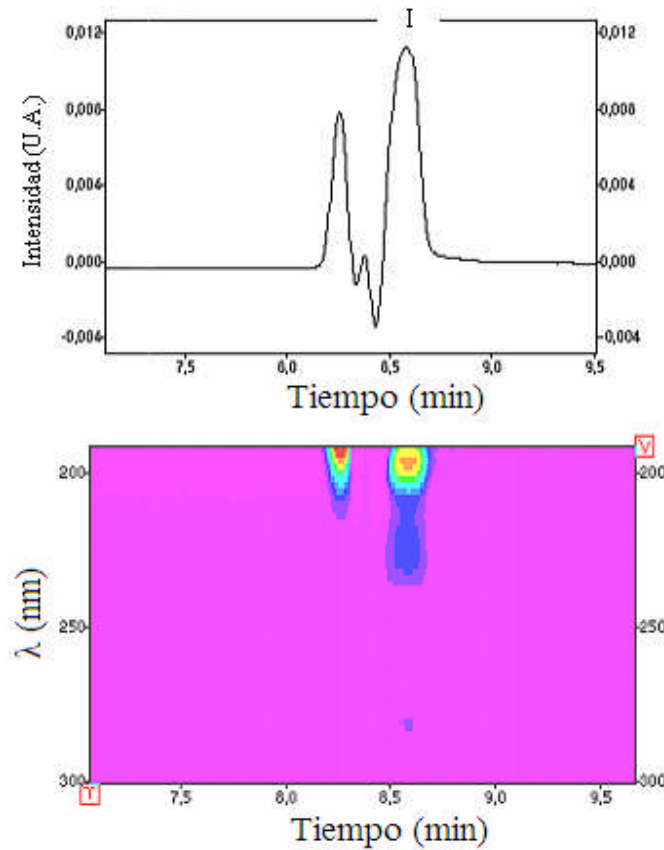
Los experimentos subsiguientes fueron realizados utilizando el electrolito de corrida (NaAc 12,5 mM en ACN/MeOH 80:20 en volumen) también como medio para la introducción de la muestra. Este procedimiento permitió la adquisición de electroferogramas apropiados tanto en la zona de oligómeros de  $n$  bajos ( $n$  entre 3 y 5) como en la de los metabolitos lipofílicos (NP1EO, NP2EO y NP), sin provocar cambios sustanciales en la resolución de las especies más largas de  $\text{NP}_n\text{EO}$ .

Las Figuras 21 y 22 también fueron preparadas a partir de experimentos llevados a cabo con detección de arreglo de diodos. En la Figura 21 se muestra la separación alcanzada para una muestra de 660 mg/l del NP10EO comercial; la posición de los picos puede correlacionarse con los

espectros de absorción UV en los diagramas bidimensionales. La presencia de concentraciones bajas de los compuestos estrogénicos NP2EO y/o NP1EO (con tiempos de migración alrededor de 8,3 min) en el tensioactivo evaluado es evidente. Además, puede diferenciarse el pico correspondiente a NP3EO, migrando como un complejo cargado positivamente. Por otro lado, en la Figura 22 se puede observar al NP migrando como un anión hetero-conjugado, bien resuelto de la estructura del BGE. La ausencia de solapamiento de señales está sustentada por los espectros registrados con el DAD.



**Figura 21:** Electroferograma adquirido a longitud de onda simple y múltiple. Muestra: NP10EO  $660 \text{ mg}^1$  en BGE. El II indica el pico de NP1EO + NP2EO. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda simple = 196 nm, tiempo de inyección (a 0,5 psi) = 5,0 s

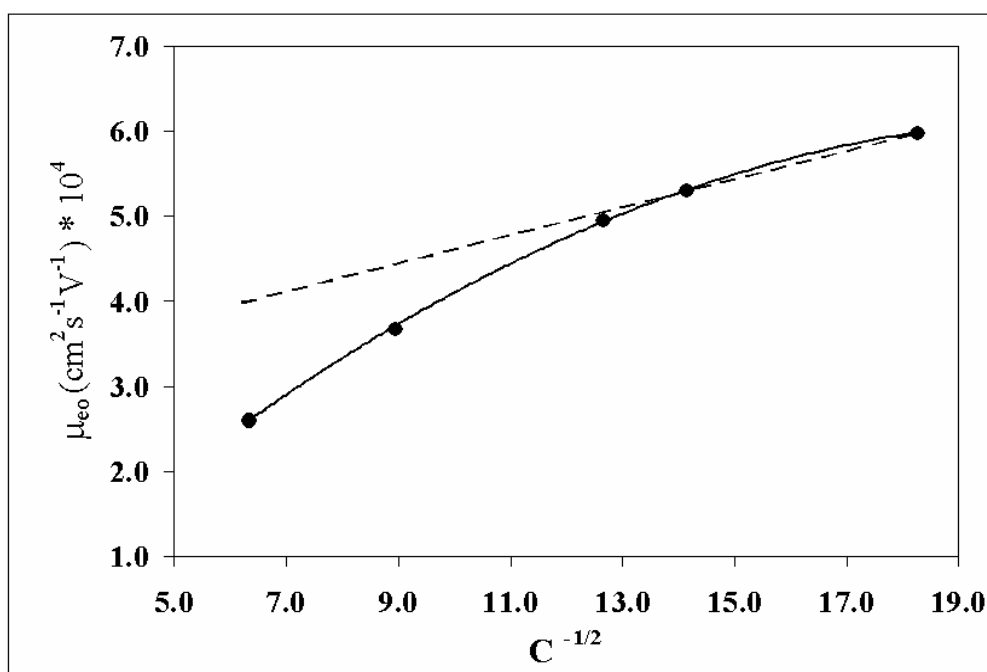


**Figura 22:** Electroferograma adquirido a longitud de onda simple y múltiple. Muestra: NP 20 mg/l en BGE. BGE: NaAc 12,5 mM en ACN/MeOH (80:20). El I indica el pico de NP. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda simple = 196 nm, tiempo de inyección (a 0,5 psi) = 5,0 s

### 3.2.5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE

En soluciones iónicas ideales (es decir, en ausencia de pares iónicos), un aumento de la concentración del electrolito reduce el potencial  $\zeta$  debido a un aumento de la fuerza iónica, causando una reducción en el EOF. De acuerdo con la Ec. (16), un gráfico de movilidad electroosmótica versus  $C^{-1/2}$ , donde  $C$  es la concentración de un electrolito 1:1 completamente disociado (en moles/l), debería ser lineal. En la Figura 23 se muestra el gráfico de  $\mu_{eo}$  vs  $C^{-1/2}$ , con  $C$  = concentración de NaAc en moles/l en ACN/MeOH (80:20). En el gráfico se observa una desviación

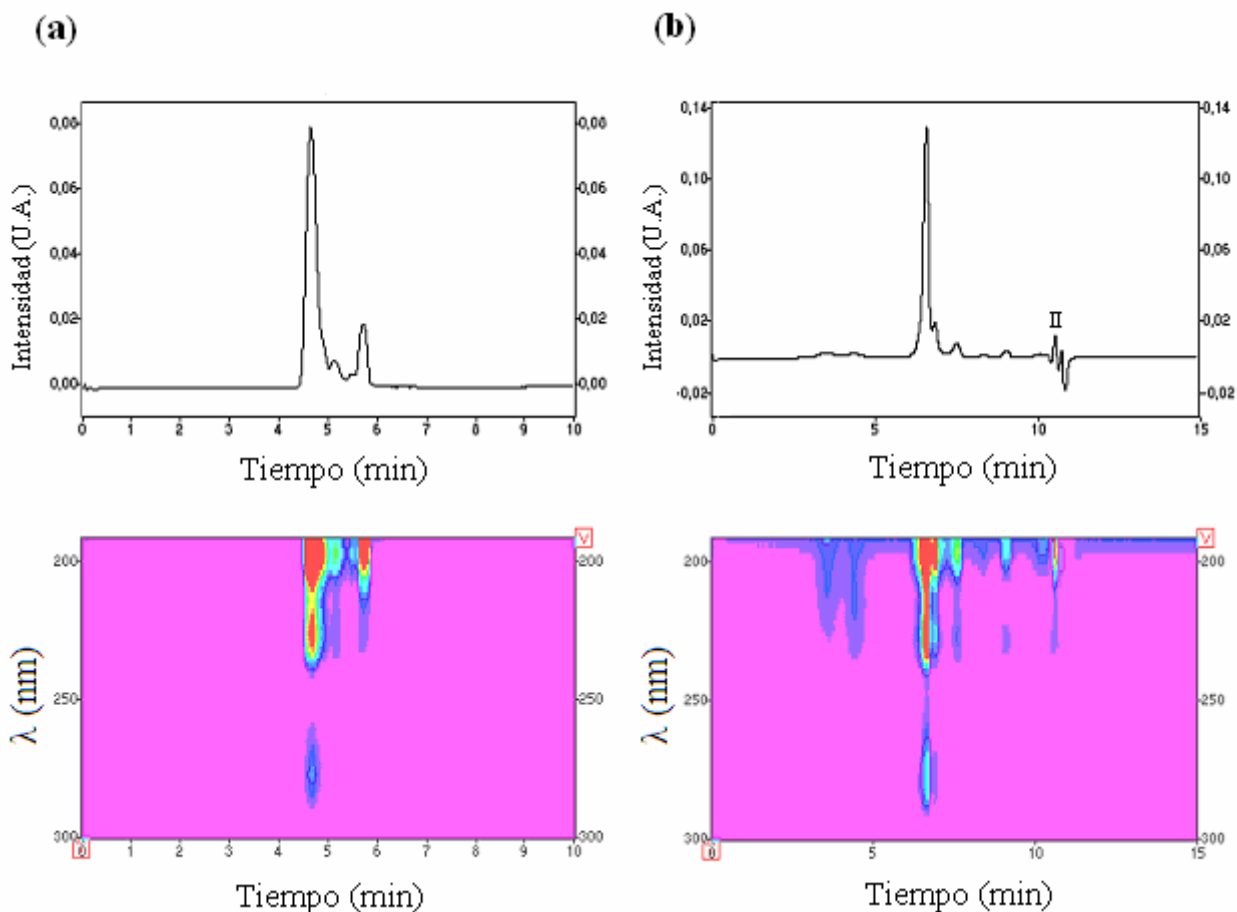
de una línea recta (línea punteada) para concentraciones de la sal mayores que 6,25 mM. Sin embargo, una curvatura negativa (es decir, un descenso de la movilidad electro-osmótica) es una reacción opuesta a la esperable para un mayor grado de formación de pares iónicos al aumentar la concentración de la sal. El efecto observado puede entonces ser atribuido a un aumento de las interacciones entre la superficie de la sílice y los cationes  $\text{Na}^+$  a medida que la concentración de la sal crece, causando así una disminución de la carga efectiva sobre la pared del capilar ( $\sigma_0$ ) [Salimi-Moosavi y Cassidy, 1995].



**Figura 23:** Movilidades electro-osmóticas para BGE's con diferentes concentraciones molares de NaAc en ACN/MeOH (80:20). Condiciones instrumentales:  $V = 15 \text{ kV}$ ,  $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ , longitud de onda simple = 196 nm, tiempo de inyección (a 0,5 psi) = 5,0 s

Con respecto a la resolución de oligómeros, y si consideramos sólo la interacción analito-aditivo, se necesitará una mayor concentración de aditivo para compensar un descenso en la constante de complejación con  $n$  decreciente [Bowser *et al.*, 1998]. Este efecto, sumado a tiempos de electroforesis mayores para concentraciones de NaAc más altas, hizo que la mejor discriminación de oligómeros de cadena corta y de los metabolitos lipofílicos se obtuviera para la mayor concentración de NaAc estudiada (25 mM). En este caso, la separación de los oligómeros con 6 o más unidades etoxilo permaneció virtualmente invariable. En la Figura 24 se presentan los electroferogramas obtenidos para concentraciones de NaAc 6,25 mM y 25,0 mM .



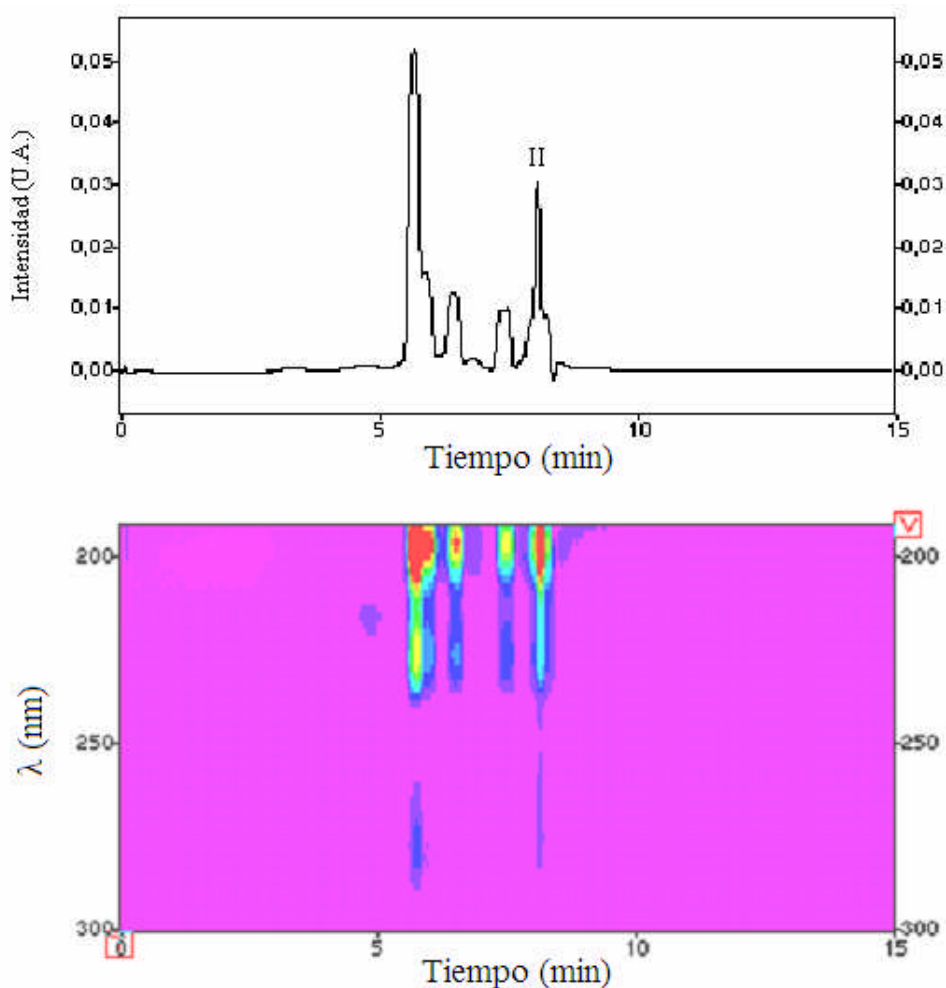


**Figura 24:** Electroferogramas de NP10EO 660 mg/l para dos concentraciones de NaAc diferentes en el BGE. BGE'S: (a) NaAc 6,25 mM y (b) 25,0 mM NaAc, ambos en ACN / MeOH (80:20). Muestras: disueltas en el BGE. El II indica el pico de NP1EO + NP2EO. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda simple = 196 nm, tiempo de inyección (a 0,5 psi) = 5,0 s

### 3.2.6. DISCRIMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS

Una de las potenciales aplicaciones de la metodología estudiada es la discriminación entre tensioactivos de longitudes de cadena nominales similares. Los electroferogramas obtenidos con electrolitos de NaAc en un medio 80% ACN – 20% MeOH deberían diferenciarse de acuerdo a las características de las formulaciones comerciales, pudiendo aplicarse en la obtención de huellas

digitales de los diferentes productos [Heinig y Vogt, 1999]. Con el objeto de evaluar la potencialidad de nuestra metodología para discriminar entre dos productos disponibles comercialmente (NP10EO y NP7.5EO), corrimos una muestra de 550 mg/l de PONPE7.5 disuelto en BGE. El electroferograma obtenido, presentado en la Figura 25, difiere marcadamente del patrón de picos característico obtenido para el NP10EO (mostrado en la Figura 21), indicando que efectivamente el método desarrollado podría ser apropiado para diferenciar formulaciones de NP $n$ EO. La intensidad de las señales correspondientes a los oligómeros superiores ( $n > 6$ ) disminuyó ostensiblemente, con un aumento concomitante en la intensidad del resto de los picos, evidenciándose la presencia de una mayor cantidad de los compuestos estrogénicos NP1EO y NP2EO.



**Figura 25:** Electroferograma adquirido a longitud de onda simple y múltiple. Muestra: PONPE 7.5 550 mg/l en BGE. BGE: NaAc 12,5 mM en ACN/MeOH (80:20). El II indica el pico de NP1EO + NP2EO. Condiciones instrumentales: V = 15 kV, T = 15 °C, longitud de onda simple = 196 nm, tiempo de inyección (a 0,5 psi) = 5,0 s.

En resumen, el abordaje descripto sugiere caminos para mejorar la selectividad en las separaciones por electroforesis capilar a través de la utilización de electrolitos soporte en solventes orgánicos. Variando la composición de la mezcla de solventes fue posible cambiar de una manera racional la velocidad del EOF y además promover las interacciones entre el aditivo iónico y los analitos. Se observó que, además de la viscosidad y la constante dieléctrica de los solventes y sus mezclas, también sus propiedades como aceptores y donores de electrones pueden influenciar las movilidades electroforéticas de los solutos y la velocidad del flujo electro-osmótico.

Se probó que la separación de oligómeros de cadena etoxilada larga depende de la presencia de acetato de sodio en el medio, un resultado atribuible a la formación de especies cargadas positivamente a partir de la complejación de los grupos etoxilo con el  $\text{Na}^+$ . Aunque la mejor resolución se obtuvo para las moléculas con un número de grupos etoxilo ( $n$ ) entre 3 y 6, pudo alcanzarse una discriminación de oligómeros con un  $n$  hasta 11 utilizando como solvente ACN en presencia de un 10% de agua.

La discriminación de etoxímeros con  $n < 3$  se alcanzó a través del empleo, como solvente, de una mezcla 80% ACN – 20% MeOH conteniendo NaAc en concentraciones 12,5 o 25 mM. La separación del NP es atribuida a la hetero-conjugación con los iones  $\text{Ac}^-$  del electrolito. La mejora en la selectividad tanto para el nonilfenol como para los oligómeros mono- y dietoxilado surgió principalmente de la disolución de la muestra en el BGE de corrida, y del uso de los espectros de absorción de los analitos obtenidos con el detector de arreglo de diodos.

#### 4. CONCLUSIONES

En esta parte del trabajo de tesis, se exploró la separación electroforética de los poli-etoxilatos de nonilfenol y sus productos de degradación, a través de diversos mecanismos en medios hidro-orgánico y no-acuoso.

En medio hidro-orgánico, tanto los analitos ionizables como los neutros migraron como aniones. La prevalencia de agua como solvente originó interacciones de tipo hidrofóbico entre las moléculas de los analitos y un aditivo anfifílico aniónico, y se obtuvo una buena selectividad en condiciones

donde la formación de micelas se encontraba inhibida. Se empleó un modo de separación derivado de la MECK, conocido como *asociación solvofóbica*, resultando una muy buena alternativa a la hora de determinar simultáneamente los poli-etoxilatos y sus metabolitos. Esto se logró a través de la explotación de interacciones lipofílicas entre los analitos y el tensioactivo aniónico SDS, en buffer fosfato con concentraciones elevadas de ACN o 2-PrOH.

La eficiencia de la separación se vio fuertemente afectada por la diferencia de conductividades entre la solución de la muestra y el electrolito soporte. Se obtuvieron resultados altamente satisfactorios cuando se empleó como electrolito soporte SDS 49 mM en buffer fosfato 10 mM (pH 6,8), en presencia de 40% acetonitrilo, con las muestras disueltas en buffer fosfato 5 mM (pH 6,8) y 40% de acetonitrilo, aplicando un tiempo de inyección hidrodinámica de 2,5 s, un potencial de corrida de 15 kV y una longitud de onda de detección de 200 nm.

Al aplicar un potencial positivo, el flujo electro-osmótico se dirigió hacia el extremo de detección del capilar y el aditivo aniónico migró en dirección opuesta. Dado que la magnitud de la movilidad electro-osmótica era mayor que la de la movilidad electroforética de los complejos con carga negativa formados entre el SDS y las moléculas homólogas de los analitos, la movilidad neta de estos últimos resultó positiva. Los etoxímeros fueron separados en función de la longitud de cadena poli-etoxilada: la velocidad de migración de los analitos hacia el cátodo creció y la de contra-migración hacia el ánodo disminuyó con el aumento del carácter hidrofílico de la molécula. Por otra parte, se encontró al TMP y al BPA con un buen potencial para ser utilizados como estándares internos, dado que migraron separados de los analitos y del EOF.

El método propuesto permitió iniciar un trabajo de colaboración con grupos de investigación involucrados en el estudio de la degradación biológica de los NP $n$ EO en reactores experimentales. Se colaboró en el desarrollo y puesta a punto de un procedimiento para el enriquecimiento de un producto comercial NP10EO a partir de la fase acuosa sobrenadante de los reactores; se evaluó la recuperación de los analitos y pudo mejorarse la eficiencia hasta obtener una recuperación global del 70%.

El análisis del sobrenadante de un ensayo de biodegradabilidad estandarizado para NP10EO permitió corroborar la dificultad que el compuesto de partida encuentra para proceder hacia la mineralización; luego de los correspondientes 28 días de incubación, pudo observarse la desaparición casi completa de los etoxímeros con  $n$  alrededor de 10 y la acumulación de moléculas

con un número de grupos etoxilo menor que 4, además de la presencia del metabolito ácido NP1EC.

De acuerdo al diseño de experimentos de Plackett-Burman, se inició un estudio quimiométrico multivariado de los efectos de las numerosas variables involucradas en la separación y en la cuantificación. Sin embargo, el diseño tal como había sido planeado no pudo llegar a su fin debido a un problema severo de inestabilidad de la cobertura polimérica del capilar, presumiblemente causado por la naturaleza química del BGE utilizado y exacerbada por el arreglo instrumental, el cual hacía que el capilar quedara desnudo en un lapso relativamente corto.

Una composición de BGE alternativa, donde se reemplazó al ACN por 2-PrOH, permitió obtener un buen rendimiento analítico y, a la vez, un tiempo de vida aceptable para el capilar. La separación obtenida con el BGE de composición SDS 49 mM, 40 % 2-PrOH, fosfato 10 mM - pH 6,8 fue muy buena y el nuevo método se utilizó en una investigación sobre el efecto de los NP $n$ EO en la diversidad bacteriana de reactores SCAS. En dicho estudio, pudo apreciarse la rápida degradación primaria del NP10EO, resultando NP2EO el metabolito mayoritario, seguido por NP3EO, NP1EO y NP. En cuanto a la composición de la comunidad bacteriana, los reactores alimentados con NP10EO mostraron una alta proporción de miembros de la familia *Betaproteobacteria*, sugiriendo que este grupo taxonómico tendría un rol específico en la degradación de los AP $n$ EO.

La metodología propuesta ha demostrado una buena aptitud para el seguimiento de los procesos de degradación en reactores biológicos y sugiere, además, un buen potencial para el análisis de muestras acuosas naturales (pre-concentradas), previa optimización de los límites de detección a través del ajuste del tiempo de inyección de la muestra.

En medio no-acuoso, los analitos neutros migraron como cationes y el nonilfenol no disociado migró como un anión. La ausencia total -o la presencia mínima- de agua en un medio apropiado, dio origen a interacciones entre los extremos polares de las moléculas de los analitos y los iones de la sal adicionada, NaAc. A través de la complejación con Na<sup>+</sup>, se investigó la separación de las moléculas de NP $n$ EO con 3 ó más grupos etoxilo, mientras que para la separación de los compuestos lipofílicos NP2EO, NP1EO y NP, se exploró la hetero-conjugación con Ac<sup>-</sup>.

Los electroferogramas resultantes para composiciones de BGE consistentes en NaAc 12,5 mM y HAc 2% (v/v) disueltos en ACN, MeOH, etanol y 1-propanol mostraron que los oligómeros de NP $n$ EO migraron con velocidades aparentes mayores que la del EOF, indicando la viabilidad de la complejación con Na<sup>+</sup>. Cuando se utilizaron los electrolitos en ACN y MeOH, los tiempos de

análisis resultaron considerablemente cortos; en el caso del EtOH, la separación de los etoxilatos superiores mejoró, y una separación aún mejor de los homólogos superiores se observó al trabajar con 1-PrOH, pero las corridas resultaron inaceptablemente largas. Cuando se empleó un BGE en THF, ni el marcador del flujo electro-osmótico ni los analitos fueron detectados incluso después de 100 minutos de corrida.

A pesar de su mayor tamaño molecular, los oligómeros de cadena larga migraron más rápido que los de cadena etoxilada más corta, indicando que el grado de complejación (el cual aumenta sistemáticamente con el número de unidades EO) constituiría el factor primario en el gobierno de la migración de los cationes complejos. Por otro lado, se encontró que la adición de agua al electrolito en ACN permitía discriminar entre los NP $n$ EO de cadenas más largas, hecho razonablemente atribuible al descenso de las constantes de complejación POE-Na<sup>+</sup> en presencia de un solvente con excelente habilidad para la solvatación de cationes duros.

La respuesta electro-osmótica para los solventes puros y sus mezclas con ACN, indicó una tendencia general al aumento de la movilidad electro-osmótica con  $\epsilon_r^{1/2} / \eta$ , y un comportamiento no lineal. La presencia de ACN en el BGE resultó siempre en movilidades electro-osmóticas elevadas, hecho que puede ser explicado por una exaltación de la formación de pares iónicos sodio-acetato debido a las pobres propiedades como donador y aceptor de electrones del solvente aprótico empleado.

El comportamiento en THF puro y 10% en ACN no pudo ser explicado considerando solamente la formación de pares iónicos de la sal adicionada. La movilidad electro-osmótica se vio muy reducida, sugiriendo una reducción en la carga negativa efectiva de la pared interna del capilar que no pudo ser compensada por la disminución de la fuerza iónica. Esto se habría originado, por un lado, por la inhibición de la autoprotólisis de los grupos silanol y, por el otro, por una adsorción considerable de los cationes Na<sup>+</sup> sobre la pared del capilar cargada negativamente, en presencia de un solvente muy poco favorable para la disociación.

En el BGE conteniendo NaAc y HAc, la habilidad del ácido para formar enlaces puente de hidrógeno con la base conjugada a través de la homo-conjugación inhibió la hetero-conjugación de NP1EO, N2EO y NP por medio de interacciones hidroxilo-acetato; en esas condiciones, los metabolitos lipofílicos migraron a la velocidad del flujo electro-osmótico. Cuando se disolvió la sal en ACN sin el agregado de HAc, adicionando en su lugar un 20% de MeOH, pudo detectarse la formación de un anión hetero-conjugado entre el NP no disociado y el Ac<sup>-</sup>. La separación de los

nonilfenil éteres NP1EO y NP2EO no fue posible en esas condiciones, resultado que puede atribuirse a una hetero-conjugación poco favorecida entre el  $\text{Ac}^-$  y los grupos alcohol terminales de esos analitos en presencia de un porcentaje relativamente alto de MeOH. La búsqueda de nuevas mezclas de solventes, con menor capacidad de formación de puentes de hidrógeno que las ensayadas, permitirá en un futuro mejorar la separación de los metabolitos lipofílicos a través del favorecimiento de la formación de aniones hetero-conjugados entre los grupos terminales polares de dichos analitos y el anión de la sal adicionada.

La utilización del electrolito de corrida (NaAc 12,5 mM en ACN/MeOH 80:20 en volumen) también como medio para la introducción de la muestra, permitió la adquisición de electroferogramas mejor resueltos para los compuestos con  $n < 5$ , sin provocar cambios sustanciales en la resolución de las especies más largas de  $\text{NP}_n\text{EO}$ . Con el método propuesto, fue posible discriminar entre dos productos con  $n$  promedios de 10 y 7,5, mostrando un buen potencial para la obtención de huellas digitales de diferentes productos comerciales e incluso para la exploración cualitativa de muestras de identidad desconocida.

Finalmente, vale la pena mencionar que el problema práctico encontrado en la operación con electrolitos de base acuosa, referido a la inestabilidad de la cobertura polimérica del capilar, no se observó en NACE. Si bien se utilizó ACN como solvente base en NACE, la cobertura del capilar no se vio afectada. Esto surgiere un efecto sinérgico entre los componentes del BGE de base acuosa como causa de la inestabilidad observada.

## **CAPÍTULO 3**

### ***Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia***



## 1. INTRODUCCIÓN

La separación de los AP $n$ EO en moléculas individuales por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es un problema bi-dimensional, originado por la presencia de homólogos en cuanto a la longitud de la cadena alquílica y de oligómeros en cuanto a la longitud de la cadena etoxilada. La mejor forma de resolver este problema es, en consecuencia, utilizar de manera complementaria diferentes tipos de fases estacionarias.

Las columnas de fase inversa separan las moléculas por interacción con las cadenas hidrofóbicas, co-eluyendo los etoxímeros como un único pico. La HPLC en fase inversa es capaz de separar los compuestos homólogos OP $n$ EO y NP $n$ EO y es, por lo tanto, el método de elección cuando se desea distinguir las moléculas de acuerdo al tamaño de los sustituyentes alquílicos en el anillo aromático [Rissler, 1996; Thiele *et al.*, 1997].

Las columnas de fase normal, en cambio, tienen la capacidad de separar los compuestos poli-etoxilados y sus metabolitos de cadena corta a través de interacciones con los grupos etoxilo (de características hidrofílicas), mientras que sólo pueden ocurrir pequeñas discriminaciones con respecto al tamaño y la estructura química de la cadena alquílica en el extremo hidrofóbico de las moléculas. La HPLC en fase normal es, entonces, utilizada cuando se desea obtener información sobre la distribución de longitudes de la cadena etoxilada, y permite reconocer cambios en la composición de los AP $n$ EO debidos a proceso de bio-degradación [Rissler, 1996; Thiele *et al.*, 1997].

En el caso de los derivados de poli-etilenglicol, la cromatografía en fase normal se ha llevado a cabo sobre sílica-gel nativa y sobre fases químicamente enlazadas con sustituyentes tales como 3-cianopropilo (*columnas "ciano"*), 3-aminopropilo (*columnas "amino"*) y 2,3-dihidroxipropilo (*columnas "diol"*). En la mayoría de los casos las fases móviles estuvieron constituidas por solventes no polares del grupo de los alcanos (tales como *n*-hexano, *n*-heptano y ciclohexano), en mezclas con solventes polares como metanol, etanol, acetonitrilo, 1- y 2-propanol y tetrahidrofurano [Rissler, 1996].

Jandera y col. [Jandera *et al.*, 1990] compararon exhaustivamente los soportes de fase normal mencionados con respecto a su habilidad para separar oligómeros de NP $n$ EO, y encontraron que las columnas *amino* mostraban las mejores características entre todos los materiales estudiados.

Utilizando eluyentes compuestos por *n*-alcanos y alcoholes alifáticos, los picos de los etoxímeros superiores mostraron una asimetría considerable (*picos con cola*) con todas las fases estacionarias investigadas excepto con la *amino*. Con dicha columna, pudieron ser separados etoxímeros de hasta 20-25 unidades oxietileno en tiempos muy razonables aplicando elución con un gradiente de concentración creciente de propanol en el *n*-alcano, sin necesidad de agregar agua a la fase móvil.

Por otra parte, Ahel y Giger ya habían empleado exitosamente columnas de aminopropil-sílice y elución con gradientes de *n*-hexano/2-propanol (con detección en el ultravioleta) para la determinación de nonilfenol y nonilfenol mono- y di-etoxilados en aguas de desecho y naturales [Ahel y Giger, 1985-*a*] y de los tensioactivos polietoxilados en detergentes y en aguas de desecho [Ahel y Giger, 1985-*b*]. Más tarde, los autores acoplaron esa misma combinación de fases estacionaria y móvil a la detección de fluorescencia, para la determinación de los analitos en muestras ambientales [Ahel *et al.*, 2000-*a*; Ahel *et al.*, 2000-*b*]. En general, los análisis se han llevado a cabo a temperatura ambiente o a temperaturas levemente superiores a la ambiente.

Sobre la base de estos antecedentes se decidió, entonces, encarar la separación de los analitos utilizando una fase estacionaria de aminopropil-sílice y elución con mezclas binarias *n*-hexano/2-propanol. Se investigó la determinación de los productos de degradación lipofílicos NP1EO, NP2EO y NP empleando elución isocrática, y se incorporó la temperatura de la columna como variable experimental. Se incluyó en estos estudios al 2,4,6-trimetilfenol para ser evaluado como estándar interno.

Por otra parte, se desarrolló un método empleando elución con gradiente y se lo aplicó en el seguimiento de la evolución del perfil de oligómeros a lo largo de la degradación del tensioactivo NP10EO en reactores biológicos.

Adicionalmente, se implementó un método para la cuantificación de *octilfenol* en aguas de ensayo de peceras experimentales, en el contexto de un nuevo trabajo en colaboración. Se eligió para esas determinaciones la cromatografía sobre fase inversa con elución isocrática, por tratarse de la metodología de implementación más sencilla a la hora de determinar un único analito.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. INSTRUMENTAL**

#### **Experimentos en fase normal:**

Bomba binaria *SpectraSERIES P200* (Thermo Separation Products, Estados Unidos)

Válvula de inyección Rehydrone 7125 (Estados Unidos)

Calefactor para columnas de HPLC Eppendorf CH-30, con un sistema de control de temperatura Eppendorf TC-50 (Alltech, Estados Unidos)

Detector UV/visible *SpectraSERIES UV100* (Thermo Separation Products, Estados Unidos)

Espectrofotómetro UV/Visible con arreglo de diodos HP-8453 (Hewlett-Packard, CA, USA).

#### **Experimentos en fase inversa:**

Cromatógrafo líquido KNK-500-A (Konik Instruments, España). El módulo incluye una válvula de inyección Rehydrone 7125 (Estados Unidos)

Detector UV/visible LINEAR UVVIS 204 (Linear Instruments, Estados Unidos)

Detector de fluorescencia molecular Linear LC-305 (Linear Instruments, Estados Unidos).

En ambos casos, los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el software *Konikrom 5.2* (Konik Instruments, España)

## 2.2. MATERIALES Y REACTIVOS

Nonilfenol grado técnico (*t*-NP, Fluka, Suiza)

4-NP1EO (Promochem, Alemania)

4-NP2EO (Promochem, Alemania)

NP1EC (Promochem, Alemania)

NP $n$ EO con promedios de 4 y 10 unidades de óxido de etileno (Proquimia S.A., Chile)

2,4,6-trimetilfenol (Fluka, Suiza)

4-*ter*-octilfenol (97% , Aldrich)

*n*-Hexano (grado HPLC, Sintorgan, Argentina)

*Hexanos*, que consiste en 95% *n*-hexano y 5% isómeros ramificados (grado HPLC, Sintorgan, Argentina)

2-Propanol (grado HPLC, Sintorgan, Argentina, para las corridas isocráticas, y J.T. Baker, Estados Unidos, para las corridas con gradiente)

Metanol (grado HPLC, Merck)

Agua *nanopure*, resistividad 18 M $\Omega$  cm, obtenida con una unidad de purificación de agua Simplicity (Millipore, SP, Brasil)

Columnas de aminopropil-silice Pinnacle II (Restek, Estados Unidos) y Hypersil APS-1 (Thermo Finnigan, Estados Unidos), y de fase inversa polimérica PRP-1 (Hamilton, Estados Unidos)

Relleno de octadecil-sílice para extracción en fase sólida (CEC-18, UCT, Estados Unidos)

## 2.3. PROCEDIMIENTOS

### Fase normal:

Las soluciones estándar de los analitos se prepararon por dilución y mezcla, en ciclohexano, de soluciones madre de 1000 mg/l de los compuestos individuales en ese solvente. Todas las soluciones fueron conservadas a 4 °C.

Las separaciones se realizaron sobre columnas de amino-sílice con partículas de 5 µm y dimensiones de 250 x 4,6 mm. La elución se realizó con mezclas *hexanos/2-PrOH* preparadas a diario. Las columnas se dejaban equilibrar hasta alcanzar una línea de base estable (aproximadamente por 30 minutos), al comienzo de la operación del equipo o cuando se cambiaba la composición del eluyente, el caudal o la temperatura.

Los estudios sobre el efecto de la temperatura se desarrollaron entre 25 y 60 °C. Por un lado, el calefactor para columnas empleado no permitía alcanzar temperaturas más bajas que la ambiente; por el otro, no se examinaron temperaturas mayores que 60 °C para evitar un posible daño a la columna y a la celda del detector [Vanhoenacker y Sandra, 2005] y para preservar la seguridad con respecto a los solventes altamente inflamables utilizados en la elución. El horno para columna utilizado brindaba una precisión de 0,1 °C en el ajuste de esa variable. El reservorio del eluyente se mantuvo siempre a temperatura ambiente.

La colección de fracciones de HPLC para análisis por GC-MS se realizó a través de una válvula manual de 3 vías (Rheodyne 7030RV, Estados Unidos). Los eluatos colectados fueron inyectados en el cromatógrafo gaseoso luego de la evaporación parcial de los solventes de HPLC bajo corriente de N<sub>2</sub> para concentrar la muestra.

Los factores de retención ( $k$ ) experimentales fueron calculados como:

$$k = (t_r - t_0) / t_0 \quad \text{Ec. (1)}$$

donde  $t_r$  es el tiempo de retención del analito (computado en el máximo absoluto del pico en el caso de picos desdoblados), y  $t_0$  es el tiempo muerto (medido a partir del pico del solvente).

Luego, los factores de selectividad ( $\alpha$ ) para un par de compuestos ( $a, b$ ) se calcularon como:

$$\alpha = k_a / k_b$$

Ec. (2)

Para la obtención de coeficientes por análisis de regresión lineal se utilizó el programa de cálculo Matlab.

La identificación de los compuestos con menos de tres unidades de óxido de etileno se realizó mediante adición estándar de *t*-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, mientras que los picos correspondientes a los oligómeros superiores fueron asignados a partir de la secuencia de elución.

#### **Fase inversa:**

Las soluciones estándar de octilfenol se prepararon por dilución, en metanol, de una solución madre de 1000 mg/l en ese solvente. Todas las soluciones fueron conservadas a 4 °C.

Las separaciones se realizaron sobre una columna polimérica (PRP-1), con partículas de 10 µm y dimensiones de 250 x 4,6 mm. La elución se realizó con mezclas metanol/agua preparadas a diario. La columna se dejaba equilibrar hasta alcanzar una línea de base estable (aproximadamente por 30 minutos), al comienzo de la jornada de trabajo.

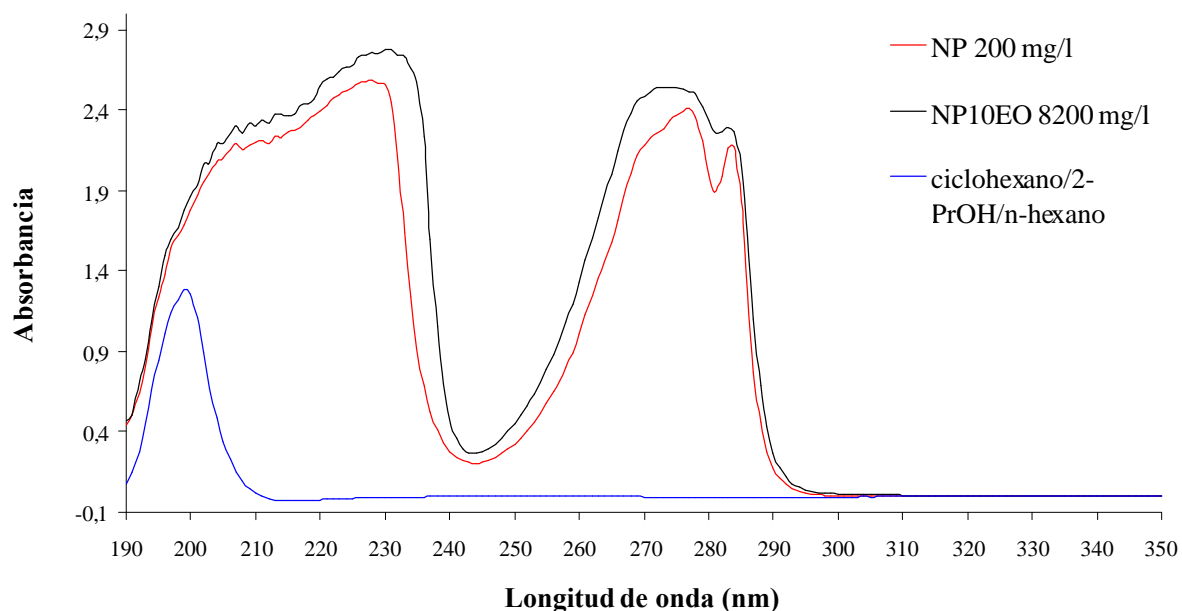
### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. ELUCIÓN ISOCRÁTICA DE LOS METABOLITOS ESTROGÉNICOS**

##### **3.1.1. ESTUDIOS A TEMPERATURA AMBIENTE**

Se eligió para estos ensayos una columna de 250 x 4,6 mm y tamaño de partícula 5 µm (Pinnacle II Amino, Restek), la cual fue empleada sin termostatación.

En primer lugar, se adquirieron los espectros de absorción de los analitos utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos. En la Figura 1 se comparan los espectros de soluciones de *t*-NP y NP10EO en el solvente de elución de HPLC (una mezcla *n*-hexano/2-propanol) y el de una mezcla del solvente de inyección de muestra (ciclohexano) y los de elución.



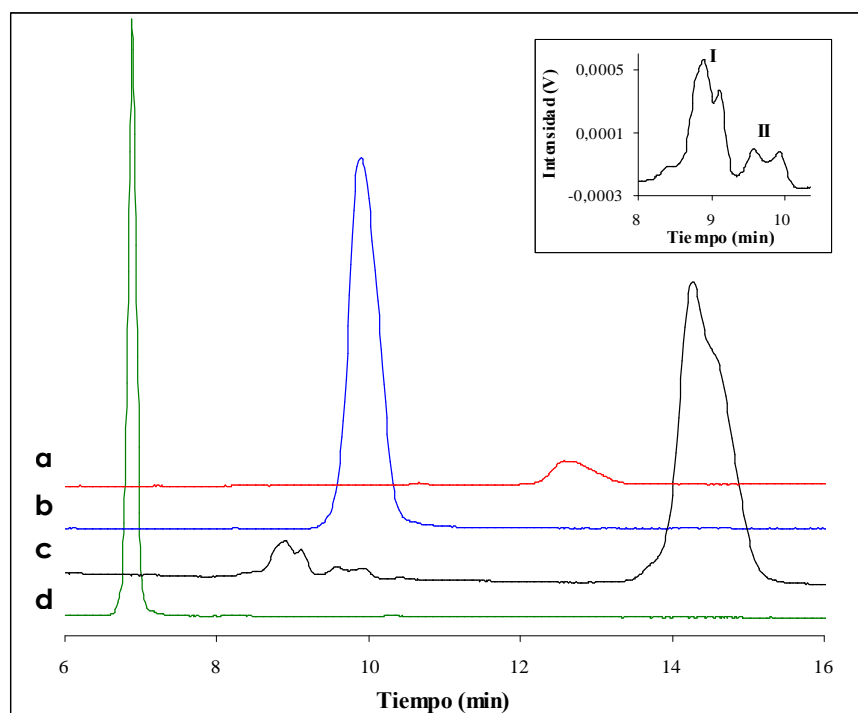
**Figura 1:** Espectros de absorción de *t*-NP y NP10EO en *n*-hexano/2-propanol, y de una mezcla ciclohexano/*n*-hexano/2-propanol.

Pudo observarse que la máxima absorción de los analitos, libre de la absorción de los solventes, se presentaba alrededor de los 230 y los 277 nm. Se decidió realizar la detección a 277 nm a pesar de tratarse de un máximo de menor intensidad que el de 230 nm ya que la longitud de onda mayor presentaría, en principio, una mayor selectividad durante la determinación de los analitos en muestras reales.

Los primeros experimentos se realizaron con una mezcla *n*-hexano/2-propanol (70:30) como eluyente. Inmediatamente, se notó una significativa generación de burbujas a la salida de la cámara mezcladora de solventes de la bomba binaria. Si bien se estaba operando en modo isocrático, el eluyente pasaba a través de esa parte del equipo en su camino hacia la columna, lo que originaba un problema severo. Aún cuando se cambió a *n*-hexano puro como eluyente, la generación de burbujas persistió. No se encontró en el equipo ningún problema técnico, pero se hizo evidente la necesidad de desgasificar los solventes por burbujeo de He en forma prácticamente continua (durante 10 minutos cada una hora) a lo largo de la jornada de trabajo. Esa solución, además de resultar tediosa,

representaba una alternativa de costo elevado (el He es un gas relativamente caro) especialmente teniendo en cuenta que no se deseaba, en principio, realizar elución con gradiente (en cuyo caso sí es común observar generación de burbujas como producto del mezclado de los solventes). Se optó entonces por saltar la cámara mezcladora, cambiando ciertas conexiones de las tuberías de solventes. Esta última alternativa, que no implicaba costos económicos ni de operación adicionales, restringió el uso de la bomba al modo isocrático.

Los resultados obtenidos entonces con los dos eluyentes señalados (*n*-hexano/2-propanol (70:30) y *n*-hexano puro) a partir de la inyección de *t*-NP fueron los siguientes: con la mezcla conteniendo un elevado porcentaje del solvente polar el analito salió muy rápidamente, muy cerca del pico del solvente; con el solvente no polar puro, el analito no eluyó ni aún después de 2 horas de corrida (a un caudal de 1 ml/min). Por eso, se pensó en una mezcla *n*-hexano/2-propanol de concentración intermedia y se ensayó una dilución 1/10 de la anterior, resultando en un eluyente de composición 97% *n*-hexano/3% 2-propanol. La Figura 2 muestra, superpuestos, los cromatogramas obtenidos por inyección de los analitos y el estándar interno en dichas condiciones.



**Figura 2:** Cromatogramas de HPLC de (a) 4-NP2EO 1,2 mg/l, (b) 4-NP1EO 6,0 mg/l, (c) *t*-NP 5,0 mg/l y (d) TMP 2,5 mg/l, todos en ciclohexano. Recuadro: ampliación de la zona del cromatograma correspondiente a los compuestos asociados al 4-NP en el producto técnico. Fase móvil: 3,0% 2-



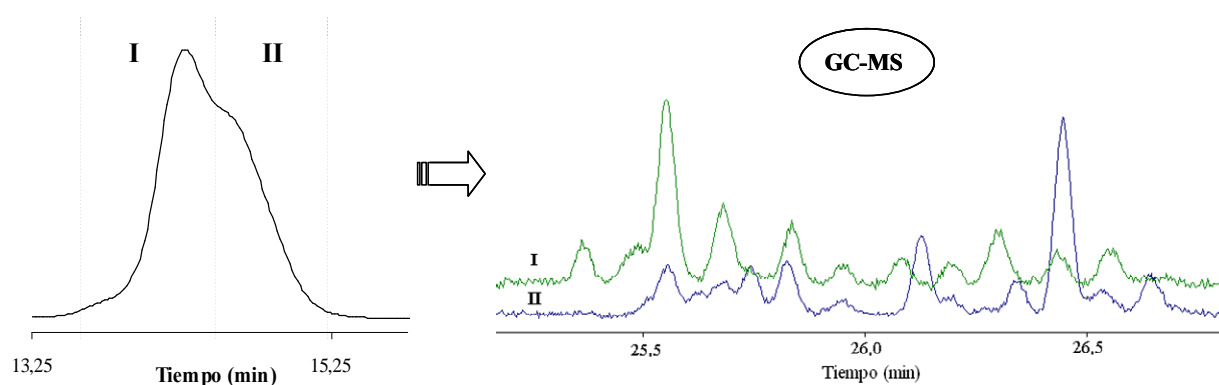
PrOH/97% *n*-hexano. Caudal: 1,00 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Volumen de inyección: 100 µl. Temperatura ambiente.

Todos los compuestos inyectados fueron detectados en tiempos razonables excepto el metabolito ácido de los NP $n$ EO, el NP1EC, el cual no apareció ni aún en 4 horas de corrida. Se pensó que podía estar ocurriendo una reacción química entre el grupo carboxilato del analito y los grupos amino de la fase estacionaria de la columna, y esta hipótesis fue confirmada por el fabricante: las columnas amino pueden reaccionar de forma irreversible con los compuestos que poseen grupos carbonílicos, impidiendo su determinación. Se decidió de todos modos seguir trabajando con la fase estacionaria amino, pero sin perder de vista que, dada la relevancia que la cuantificación de los metabolitos ácidos en muestras ambientales y de laboratorio tendría, sería importante investigar en un futuro la separación selectiva de esos compuestos en forma conjunta con la de los metabolitos mono- y di-etoxilados y el nonilfenol, utilizando alguna clase de soporte de fase normal alternativo, como por ejemplo columnas *ciano* o *diol*, o algunos más recientemente desarrollados, como las fases *fluoradas*.

Se encontró que los cromatogramas de nonilfenol grado técnico (Fluka), el cual está constituido mayoritariamente por 4-nonilfenol, presentaban una contribución importante de sustancias de identidad desconocida (los grupos de picos I y II en la Figura 2) que eluían con tiempos de retención similares a los de 4-NP1EO. Para otro *t*-NP disponible comercialmente (Kanto Chem., Japón) se obtuvo un perfil de picos similar. Con el objeto de obtener información sobre la identidad de esas sustancias, se colectaron por separado las fracciones I y II de HPLC y se las analizó por GC-MS. Para la fracción I, se obtuvo un patrón característico de picos isoméricos con un ion molecular de  $m/z = 220$  (es decir, la Mr del NP), lo que sumado a los resultados de la búsqueda en la biblioteca de espectros del equipo, apuntó a una mezcla de isómeros ramificados de nonilfenol. Como este grupo de compuestos eluyó más rápidamente que el 4-nonilfenol tanto en HPLC de fase normal como en GC, se atribuyó su identidad a la de una mezcla de isómeros de 2-NP (el isómero *orto* presenta un efecto de apantallamiento sobre la región polar de la molécula, lo que originaría por un lado una retención menor que la del isómero *para* en HPLC de fase normal [Ahel y Giger, 1985-*a*] y por el otro, un punto de ebullición menor y una menor retención que la del isómero *para* en cromatografía gaseosa [Giger *et al.*, 1981]. De hecho, se había reportado con anterioridad que el producto técnico Fluka contenía 10-15% de isómeros de 2-NP [Ahel *et al.*, 2000-*b*]. En cuanto a la fracción II, también se obtuvieron picos con un ion molecular de  $m/z$  220; si bien la búsqueda espectral no arrojó resultados claros en este caso, el ion molecular coincidente y la proximidad a los picos del grupo I tanto en las separaciones de HPLC como de GC, apuntaron también a un sub-

grupo de isómeros de 2-NP. La potencial co-elución de ambos grupos de compuestos con 4-NP1EO debía, entonces, ser tomada en cuenta al optimizar la separación, ya que si bien no representan más que el 15% del nonilfenol en el producto técnico, el solapamiento de estos componentes minoritarios podría conducir a una cuantificación inexacta del metabolito mono-etoxilado (tal como se tratará detalladamente en el Capítulo 4 de esta tesis, hemos encontrado en muestras ambientales concentraciones de *t*-NP aproximadamente 5 veces mayores que las de 4-NP1EO).

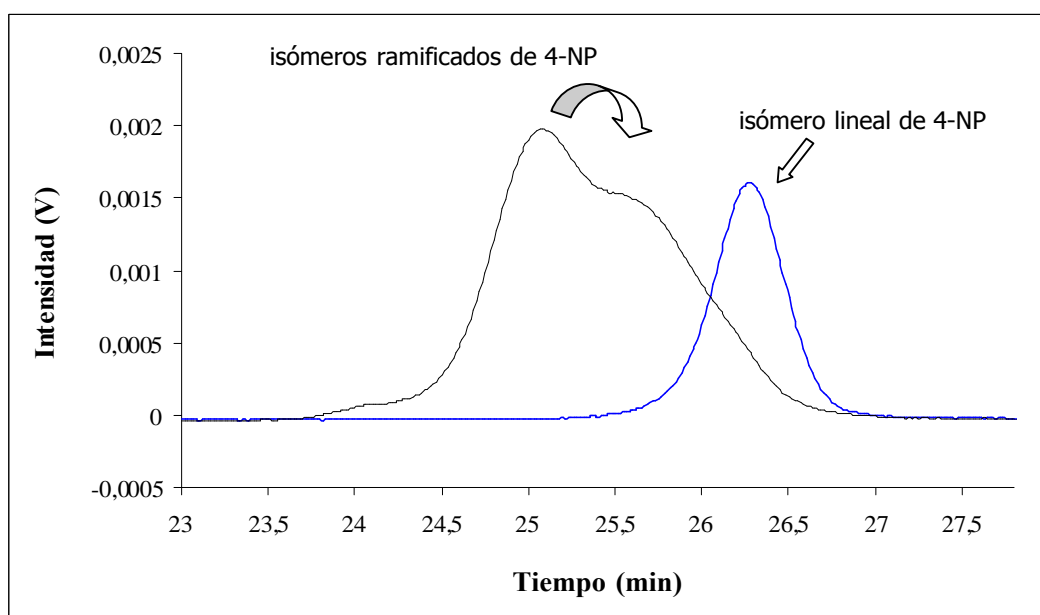
Por otra parte, el análisis de la forma de los picos en cromatogramas como los de la Figura 2 permitió sacar otras conclusiones interesantes. El 4-NP, que es una mezcla de isómeros ramificados de la cadena alquílica, eluyó como un pico claramente desdoblado. Este doble pico fue analizado utilizando el software *Peak-Fit* para su deconvolución. Se obtuvieron así dos picos gaussianos de áreas comparables, sugiriendo (de un modo similar a lo ocurrido en las separaciones por electroforesis capilar) la separación parcial de dos grupos de isómeros. En los sistemas de fase normal la región polar de las moléculas contribuye más fuertemente a la retención que la configuración de la cadena alquílica; sin embargo, las diferencias en esta última característica podrían originar un desdoblamiento de los picos [Rissler, 1996; Jandera *et al.*, 1998]. A fin de confirmar esa presunción, se colectaron las dos fracciones distinguibles de un pico de 4-NP (marcadas I y II en la Figura 3, en donde se muestra ampliada la zona del analito en las condiciones de la Figura 2). Estas fracciones fueron evaporadas a sequedad y redisolventadas para su inyección en GC-MS; los cromatogramas obtenidos se muestran también en la Figura 3.



**Figura 3:** Ampliación de la zona del cromatograma de HPLC correspondiente al 4-NP en las condiciones de la Figura 2, seguido por los cromatogramas de GC-MS de las fracciones I y II.

Los dos patrones de picos de GC-MS, conformados por isómeros de cadena alquílica del nonilfenol, resultaron sustancialmente diferentes. La adición de ambas señales (I + II) reproduce exactamente el cromatograma que se obtiene por inyección directa de una solución estándar de 4-NP, lo cual constituye una validación del procedimiento empleado y confirma nuestra hipótesis.

Adicionalmente, se inyectó una solución del isómero de cadena lineal (4-*n*-NP), con la idea de comparar su comportamiento con el de la mezcla de isómeros ramificados (el compuesto lineal se ha utilizado como estándar interno en la determinación de NP por cromatografía gaseosa, ya que no se encuentra presente en el producto técnico) [Günther *et al.*, 2001]. En la Figura 4 se presentan superpuestos los cromatogramas de 4-NP (mezcla técnica) y 4-*n*-NP. En las condiciones de esta corrida (un caudal significativamente menor que el de la Figura 2) se ve aún con mayor claridad el desdoblamiento del pico en el producto técnico, en notorio contraste con el pico del compuesto lineal, cuya forma es prácticamente gaussiana.

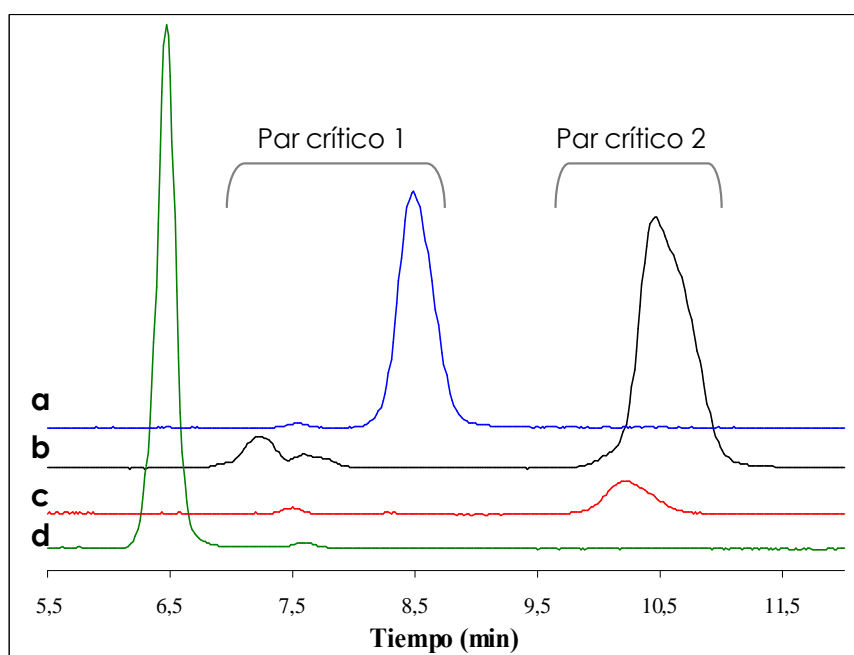


**Figura 4:** Cromatogramas de HPLC de 4-NP (mezcla técnica) 2,5 mg/l y 4-*n*-NP 1,0 mg/l en ciclohexano. Fase móvil: 3,0% 2-PrOH/97% *n*-hexano. Caudal: 0,55 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Volumen de inyección: 100  $\mu$ l. Temperatura ambiente.

Con respecto a la pureza del *n*-hexano utilizado para la elución, probamos que el uso de *hexanos* (95% *n*-hexano/5% mezcla de hexanos ramificados) o 100% *n*-hexano (tal como se presenta usualmente en la literatura) brindaba resultados cromatográficos equivalentes. Esto representó para nosotros una gran ventaja, ya que el costo de los *hexanos* es mucho menor que el del producto

100% lineal, por lo que se decidió utilizar en adelante dicho solvente como componente de la fase móvil.

Nuevos experimentos, llevados a cabo con mezclas eluyentes de mayor y menor proporción de 2-propanol alrededor del 3% inicial, permitieron arribar a las siguientes conclusiones preliminares: las resoluciones críticas eran las de los pares 2-NP/4-NP1EO (*par crítico 1*) y 4-NP2EO/4-NP (*par crítico 2*). Todas las demás separaciones ocurrían casi completamente aún cuando estos dos pares de compuestos se encontraban completamente solapados. En la Figura 5 se muestran cromatogramas obtenidos con un eluyente 5,5% 2-propanol a un caudal de 0,85 ml/min. En ella puede observarse la buena resolución del par 2-NP/4-NP1EO y el solapamiento del par 4-NP2EO/4-NP. La resolución del *par crítico 2* presentaba un comportamiento opuesto al del *par crítico 1*; parecía existir un efecto opuesto de la proporción de 2-propanol en el eluyente con respecto a la discriminación alcanzable para sendos pares críticos: el primero estaba bien resuelto cuando el segundo estaba solapado (Figura 5), mientras que el primer par se encontraba parcialmente solapado en las condiciones en que el segundo se encontraba bien resuelto (Figura 2).



**Figura 5:** Cromatogramas de HPLC de (a) 4-NP1EO 2,2 mg/l, (b) *t*-NP 2,5 mg/l, (c) 4-NP2EO 0,6 mg/l y (d) TMP 1,4 mg/l, todos en ciclohexano. Fase móvil: 5,5% 2-PrOH/94,5% hexanos. Caudal: 0,85 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Volumen de inyección: 100  $\mu$ l. Temperatura ambiente.

Fu entonces que, debido a las limitaciones halladas en la elución isocrática con la mezcla *hexanos/2-propanol* a temperatura ambiente, se decidió explorar una nueva variable en la separación cromatográfica: la temperatura de la columna. Con el aumento de la temperatura disminuye la viscosidad de la fase móvil y aumenta el coeficiente de difusión de los solutos; el aumento en la velocidad de transferencia de masa resulta generalmente en la mejora de la eficiencia de la columna. Otra consecuencia de una viscosidad reducida es una disminución de la contrapresión sobre la columna, permitiendo la aplicación de velocidades mayores con un mayor número de platos [Greibrokk y Andersen, 2003]. Sin embargo, y a pesar de las ventajas que esto podría representar, muchas veces los sistemas de cromatografía líquida se utilizan a temperatura ambiente.

### **3.1.2. INCLUSIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA COMO VARIABLE ACTIVA**

Comúnmente se asume que las variaciones en la temperatura de operación de HPLC no producirán, en la selectividad de las separaciones, mejoras de la misma magnitud que las que pueden alcanzarse cambiando variables tradicionales tales como las propiedades del eluyente o aplicando elución con gradiente [Greibrokk y Andersen, 2003]. No obstante, la presente disponibilidad de fases estacionarias capaces de soportar temperaturas sustancialmente superiores a la ambiente y la posibilidad de implementación directa de la técnica utilizando termostatos para columnas, alientan la aplicación en situaciones analíticas específicas. Las separaciones de HPLC bajo condiciones isocráticas presentan una clara ventaja de simplicidad operativa. En este contexto, la temperatura de la columna aparece como una alternativa interesante a la hora de realizar ajustes en la selectividad, así como de mejorar la eficiencia de la separación y acortar los tiempos de corrida [Li *et al.*, 2002; Greibrokk y Andersen, 2003].

La mayoría de los trabajos en donde se reporta la utilización de columnas cromatográficas operadas a temperaturas distintas de la ambiente tratan sobre separaciones en fase inversa [Kamiusuki *et al.*, 1999; Dolan *et al.*, 2000-*a*; Dolan *et al.*, 2000-*b*; Li *et al.*, 2002; Greibrokk y Andersen, 2003; Castells *et al.*, 2004; Gagliardi *et al.*, 2005; Gagliardi *et al.*, 2006]. Sin embargo, Rey y Pohl [Rey y

Pohl, 1996] demostraron que la temperatura de la columna es también una variable efectiva para aumentar la separación de especies mono- y di-valentes sobre columnas de intercambio catiónico. De manera similar, Hatsis y Lucy [Hatsis y Lucy, 2001] encontraron relevante el efecto diferencial de la temperatura sobre los factores de retención de varios aniones inorgánicos separados utilizando columnas de intercambio aniónico. Más recientemente, se publicó un estudio sobre la influencia de la temperatura en la separación de etoxilatos de octilfenol sobre columnas de fase normal e inversa, utilizando fases móviles hidro-orgánicas [Vanhoenacker y Sandra, 2005].

En esta parte del trabajo de tesis se estudió la incorporación de la temperatura de la columna como una variable activa en la separación en fase normal de *t*-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, y el estándar interno TMP [Ahel y Giger, 1985-*a*; Marcomini *et al.*, 1993; Ahel *et al.*, 2000-*b*]. Por el interés fundamental que revestían, se deseaba investigar en profundidad los cambios en la retención de los analitos y en la selectividad de la separación surgidos a partir de variaciones conjuntas en el caudal de fase móvil, la composición del eluyente y la temperatura de la columna. En este contexto, se consideró que modelar el comportamiento de retención, además de resultar útil para la selección de las condiciones de separación óptimas [Jandera *et al.*, 1990], contribuiría a la comprensión de aspectos de índole más teórica.

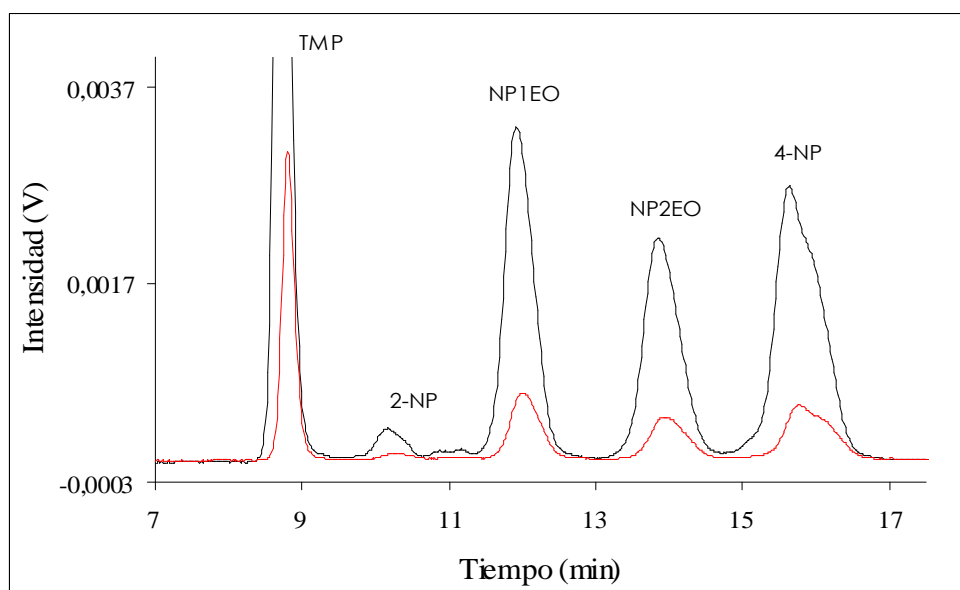
### **3.1.2.a. Selección de un método para el análisis cuantitativo**

Cuando se intentó iniciar las corridas planeadas para la investigación de los efectos de la temperatura, se detectó un detalle experimental de relevancia práctica: la columna de aminopropil-sílice que se venía utilizando hasta el momento (Pinnacle II, Restek) mostró ser susceptible a envejecimiento por circulación prolongada de concentraciones altas de 2-propanol. Se observó un descenso generalizado en los tiempos de retención, además de una pérdida de resolución para el par 4-NP2EO/4-NP, comparados con los resultados obtenidos en la etapa anterior para la misma temperatura (temperatura ambiente:  $20 \pm 2$  °C). Se encontró que se trataba de un efecto residual (o *efecto memoria*) de la recirculación de una mezcla de composición 14% 2-propanol a un caudal de 0,1 ml/min en forma continua durante 3 semanas. Se hizo entonces recircular *hexanos* (100%) a temperatura ambiente durante una semana, y el sistema se acercó al comportamiento previo, aunque

no lo alcanzó por completo. De todas maneras, se iniciaron las corridas planeadas. Sin embargo, se notó a lo largo de los experimentos que la columna no había alcanzado un estado estacionario con respecto al efecto remanente de la concentración elevada del alcohol, por lo que se decidió recircular *hexanos* (100%) a una temperatura relativamente alta (50 °C) durante 96 horas. El aumento de la temperatura permitió una eliminación adicional de 2-propanol de la columna y llevó el comportamiento cromatográfico hacia un estado estacionario que, aunque resultó inalterable a lo largo de las numerosas corridas subsiguientes, difería del inicial.

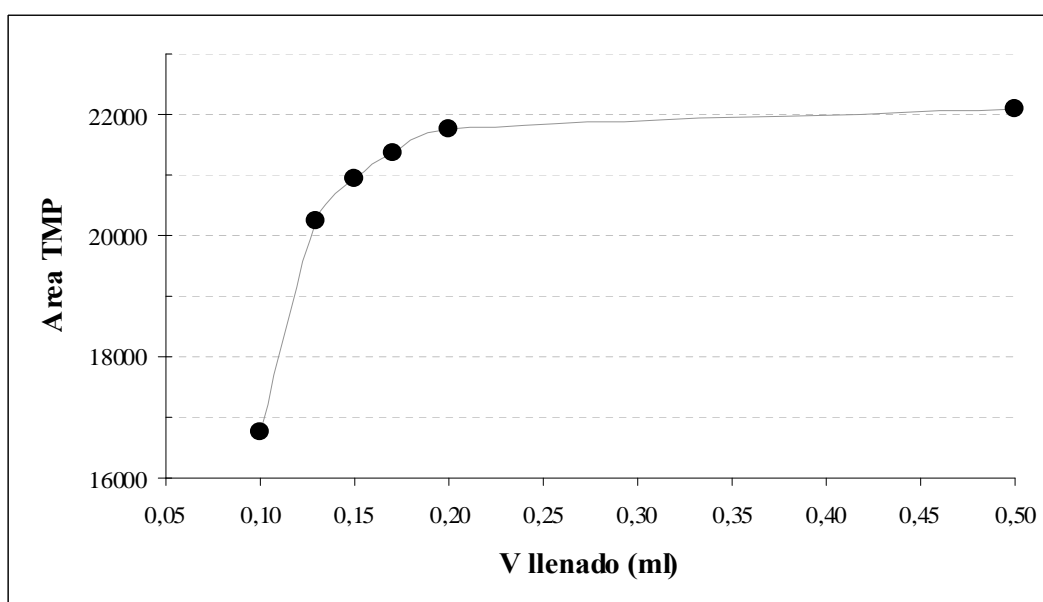
Por eso, se decidió seguir adelante en la búsqueda de las condiciones que permitieran la resolución de analitos y compuestos asociados empleando la misma columna, pero los estudios de modelado (que se presentan a continuación en este capítulo) se llevaron a cabo con una columna nueva, a la cual se cuidó de no someter a condiciones de envejecimiento.

El método seleccionado involucró una composición de fase móvil de 4,1% 2-propanol en *hexanos*, un caudal de 0,65 ml/min y una temperatura de columna de 35 °C, y permitió la resolución de todos los compuestos de interés en 17 minutos de corrida. La Figura 6 muestra los cromatogramas de la mezcla.



**Figura 6:** Cromatogramas de HPLC de la mezcla TMP, 4-NP1EO, 4-NP2EO y *t*-NP (en ciclohexano), en concentraciones de 0,5 mg/l (trazo rojo) y 2,5 mg/l (trazo negro). Fase móvil: 4,1% 2-PrOH en *hexanos*. Caudal: 0,65 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Volumen de inyección: 100  $\mu$ l. Temperatura de la columna: 35 °C.

En el método de inyección de muestra por llenado completo del bucle de carga debe usarse un exceso de volumen de muestra (que se desecha), debido a que la velocidad del fluido en el interior varía entre un máximo en el eje de la luz del tubo hasta cero en la superficie de la pared. La fase móvil tiende a permanecer en la pared del tubo, por lo que la cantidad de muestra en el bucle se aproxima a su capacidad de manera asintótica. En general, son necesarios entre 2 y 3 volúmenes de muestra (referidos a la capacidad del bucle) para alcanzar el 95% del llenado total. Este suele ser el volumen mínimo recomendado para obtener una buena reproducibilidad, aunque se recomienda 5 ó 10 volúmenes de muestra para trabajos de mayor precisión. Dado que dichos volúmenes pueden variar entre muestras y fases móviles con distintas viscosidades, pero fundamentalmente dado que en el caso particular de muestras ambientales el volumen de extracto disponible está limitado por el factor de concentración requerido, se consideró imperioso determinar experimentalmente el volumen mínimo necesario para obtener una precisión aceptable (es decir, una variabilidad mínima en el área para pequeñas diferencias en el volumen de llenado). Con ese fin, se inyectó de forma sucesiva y al menos por duplicado una solución de TMP de concentración 0,5 mg/l y se graficó el área de pico en función del volumen de muestra utilizado para el llenado del bucle de 100  $\mu$ l, tal como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7:** Gráfico de área de pico de TMP 0,5 mg/l en función del volumen de muestra utilizado para el llenado del bucle de 100  $\mu$ l. Fase móvil: 4,1% 2-PrOH en *hexanos*. Caudal: 0,65 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Temperatura de la columna: 35 °C.



De la forma de la curva se desprendió que un volumen de muestra de 2 veces el volumen del bucle (en este caso 200  $\mu\text{l}$  para un bucle de 100  $\mu\text{l}$ ) resultaba en un buen compromiso entre precisión en el área de pico y volumen de muestra desechado.

Las curvas de calibración, construidas para áreas de pico en el intervalo de concentraciones de 0,025 a 5,0  $\mu\text{g/ml}$  para cada analito y el estándar interno, presentaron en todos los casos respuestas lineales, con  $R$  mayor que 0,9996. La repetibilidad del método se evaluó a partir de 10 inyecciones sucesivas de una mezcla de concentración 0,35  $\mu\text{g/ml}$ , obteniéndose desviaciones estándar relativas menores que 3,5% para las áreas de pico y que 0,4% para los tiempos de retención. Los límites de detección, calculados como la concentración para una señal igual a  $B + 3\sigma_B$  (donde  $B$  y  $\sigma_B$  son, respectivamente, el promedio y la desviación estándar de la señal del blanco), resultaron 4, 8, 10 y 6  $\mu\text{g/l}$  para TMP, 4-NP1EO, 4-NP2EO y *t*-NP, respectivamente.

Un experimento adicional permitió ampliar el conocimiento sobre la robustez del método desarrollado. Se ensayó la inyección de la mezcla estándar utilizando bucles de 50 y 20  $\mu\text{l}$ , y se compararon los resultados con los obtenidos para un volumen de inyección de 100  $\mu\text{l}$ . No se encontraron diferencias ni en la forma de los picos ni en la resolución, como tampoco en los límites de detección de masa para los tres tamaños de bucle ensayados. Esto sumó al método un grado de versatilidad interesante a la hora de adaptarse a las condiciones de análisis de muestras reales.

Las condiciones seleccionadas permitieron alcanzar un buen rendimiento analítico (representado por la selectividad, la precisión y la sensibilidad). Se encontró al método cromatográfico apropiado, en principio, para el análisis de muestras reales, y se lo implementó exitosamente (acoplado a detección de fluorescencia molecular) en el análisis de muestras ambientales descrito en el Capítulo 4 de esta tesis.

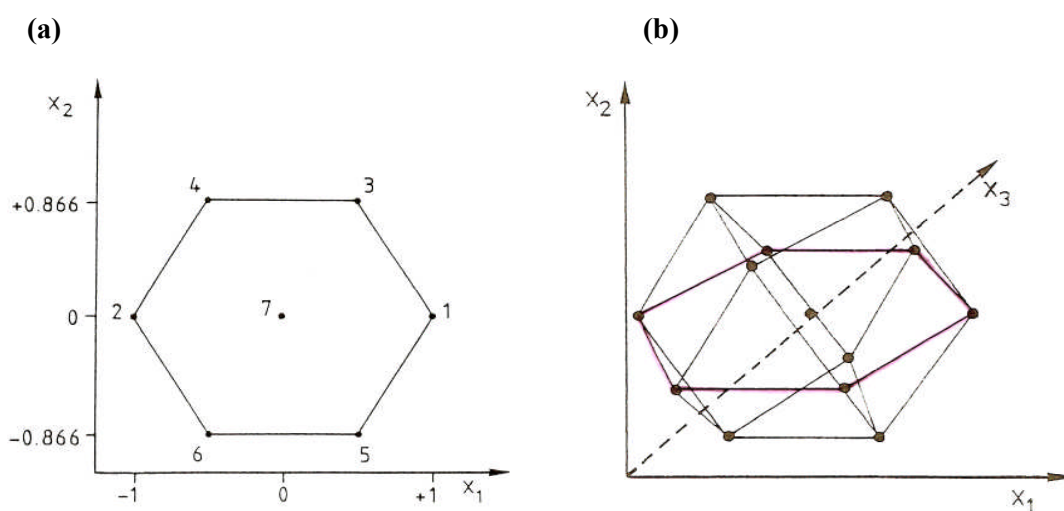
### **3.1.2.b. Modelado de la retención cromatográfica de los analitos**

En esta etapa se exploraron los efectos de la variación simultánea de la concentración de 2-PrOH en la fase móvil binaria, la temperatura de la columna y el caudal del eluyente, en la retención y la selectividad de la separación de TMP, 2-NP (grupos I y II), 4-NP1EO, 4-NP2EO y 4-NP utilizando diseño estadístico de experimentos y herramientas quimiométricas de análisis. Los intervalos de

operación investigados fueron: concentración de 2-PrOH entre 1,5 y 6,5% (v/v), temperatura del horno de columna entre 25 y 60 °C y caudal de fase móvil entre 0,2 y 1,5 ml/min. Se empleó también una columna amino de 250 x 4,6 mm y tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , aunque de una marca diferente a la anterior (APS-1, Thermo Finnigan).

### 3.1.2.b.i. Diseño estadístico de experimentos

Para la selección de los experimentos a realizar, se empleó un diseño de tipo *Doehlert*. Este tipo de diseño permitiría cubrir el espacio experimental con una buena precisión en el cálculo de los coeficientes al proponer un modelo para la retención de los analitos. Cuando se trata de obtener modelos y las correspondientes superficies de respuesta, los diseños típicos son el *central compuesto* y el de celda uniforme de *Doehlert*. El diseño introducido por *Doehlert* describe un dominio experimental esférico, pero con menos puntos que el diseño *central compuesto*, y enfatiza en la uniformidad en el llenado del espacio. Para 2 factores, el diseño *Doehlert* consiste en un punto central y seis puntos formando un hexágono (situado en un círculo) (Figura 8-a); para 3 factores (es decir, en tres dimensiones), consiste en un dodecaedro centrado (en la Figura 8-b se resalta en rosa el hexágono correspondiente a los valores que toma la variable  $X_1$ ). En ambos casos, la distancia entre todos los puntos vecinos es la misma [Massart *et al.*, 1997].



**Figura 8:** Diseño de *Doehlert* para (a) 2 variables y (b) 3 variables.

Las matrices de los diseños para 2 y 3 factores se presentan en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1.** Diseño *Doehlert* para 2 factores

Exp.	$x_1$	$x_2$
1	1	0
2	-1	0
3	0.5	0.866
4	-0.5	0.866
5	0.5	-0.866
6	-0.5	-0.866
7	0	0

**Tabla 2.** Diseño *Doehlert* para 3 factores

Exp.	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0.5	0.866	0
4	0.5	0.289	0.817
5	-1	0	0
6	-0.5	-0.866	0
7	-0.5	-0.289	-0.817
8	0.5	-0.866	0
9	0.5	-0.289	-0.817
10	0	0.577	-0.817
11	-0.5	0.866	0
12	-0.5	0.289	0.817
13	0	-0.577	0.817

En nuestro caso se llevó a cabo el diseño para 3 factores, asignándose 5 niveles a la temperatura del calefactor de columna ( $X_1$ ), 7 niveles al caudal de fase móvil ( $X_2$ ) y 3 niveles a la composición del eluyente ( $X_3$ ).

El cálculo de los valores que tomaron los factores en los diferentes experimentos ( $VE$ ) se realizó entonces según la siguiente fórmula:

$$VE = M + F \times DIS \quad \text{Ec. (3)}$$

donde  $M$  y  $DIS$  son el valor medio y la distancia del extremo al medio para cada variable, tal como se los describe en la Tabla 3, y  $F$  es el factor dado por el diseño de Doehlert según la Tabla 2.

**Tabla 3**

	Temperatura (°C)	Caudal (ml/min)	% 2-PrOH
	( $X_1$ )	( $X_2$ )	( $X_3$ )
<b>Valor mínimo</b>	25	0,2	1,5
<b>Valor máximo</b>	60	1,5	6,5
<b>Valor medio (<math>M</math>)</b>	42,5	0,85	4
<b>Distancia del extremo al medio (<math>DIS</math>)</b>	17,5	0,65	2,5

Los valores de  $F$  que definen cada corrida experimental y los valores resultantes para las variables  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  se reúnen en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Experimento	$F1$	$F2$	$F3$	$VE$		
				$X_1$	$X_2$	$X_3$
<b>1</b>	0	0	0	42,5	0,85	4,00
<b>2</b>	1	0	0	60,0	0,85	4,00
<b>3</b>	0,5	0,866	0	51,3	1,41	4,00
<b>4</b>	0,5	0,289	0,817	51,3	1,04	6,04
<b>5</b>	-1	0	0	25,0	0,85	4,00
<b>6</b>	-0,5	-0,866	0	33,8	0,29	4,00
<b>7</b>	-0,5	-0,289	-0,817	33,8	0,66	1,96
<b>8</b>	0,5	-0,866	0	51,3	0,29	4,00
<b>9</b>	0,5	-0,289	-0,817	51,3	0,66	1,96
<b>10</b>	0	0,577	-0,817	42,5	1,23	1,96
<b>11</b>	-0,5	0,86	0	33,8	1,41	4,00
<b>12</b>	-0,5	0,289	0,817	33,8	1,04	6,04
<b>13</b>	0	-0,577	0,817	42,5	0,47	6,04

Se agregaron además algunas corridas tomando los valores extremos de temperatura (25 y 60 °C) y concentración de 2-PrOH (1,5 y 6,5 %), a un caudal de 0,85 ml/min. En la Tabla 5 se presentan todos los experimentos en el orden en que fueron llevados a cabo (las corridas adicionales son las 1-3 y 18-20), y se incluyen también los tiempos de retención resultantes (es decir, la variable medida) para cada combinación de los factores  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ .

En cada corrida experimental se inyectaron, al menos por duplicado, dos soluciones independientes: (a) una mezcla de TMP, 4-NP1EO y 4-NP2EO de concentración 5 mg/l, y (b) una solución de *t*-NP de concentración 5 mg/l.

Para la Figura 9 se seleccionaron cromatogramas obtenidos a 25 y 60 °C. Las composiciones de la fase móvil son 1,5, 4,0 y 6,5% 2-PrOH, y el caudal es de 0,85 ml/min.

Los cambios en la retención cromatográfica de los compuestos estudiados y en la selectividad de la separación se hicieron evidentes. Dichos cambios serán discutidos profundamente en las siguientes secciones.

**Tabla 5.** Condiciones cromatográficas y tiempos de retención experimentales de analitos y estándar interno (en min)

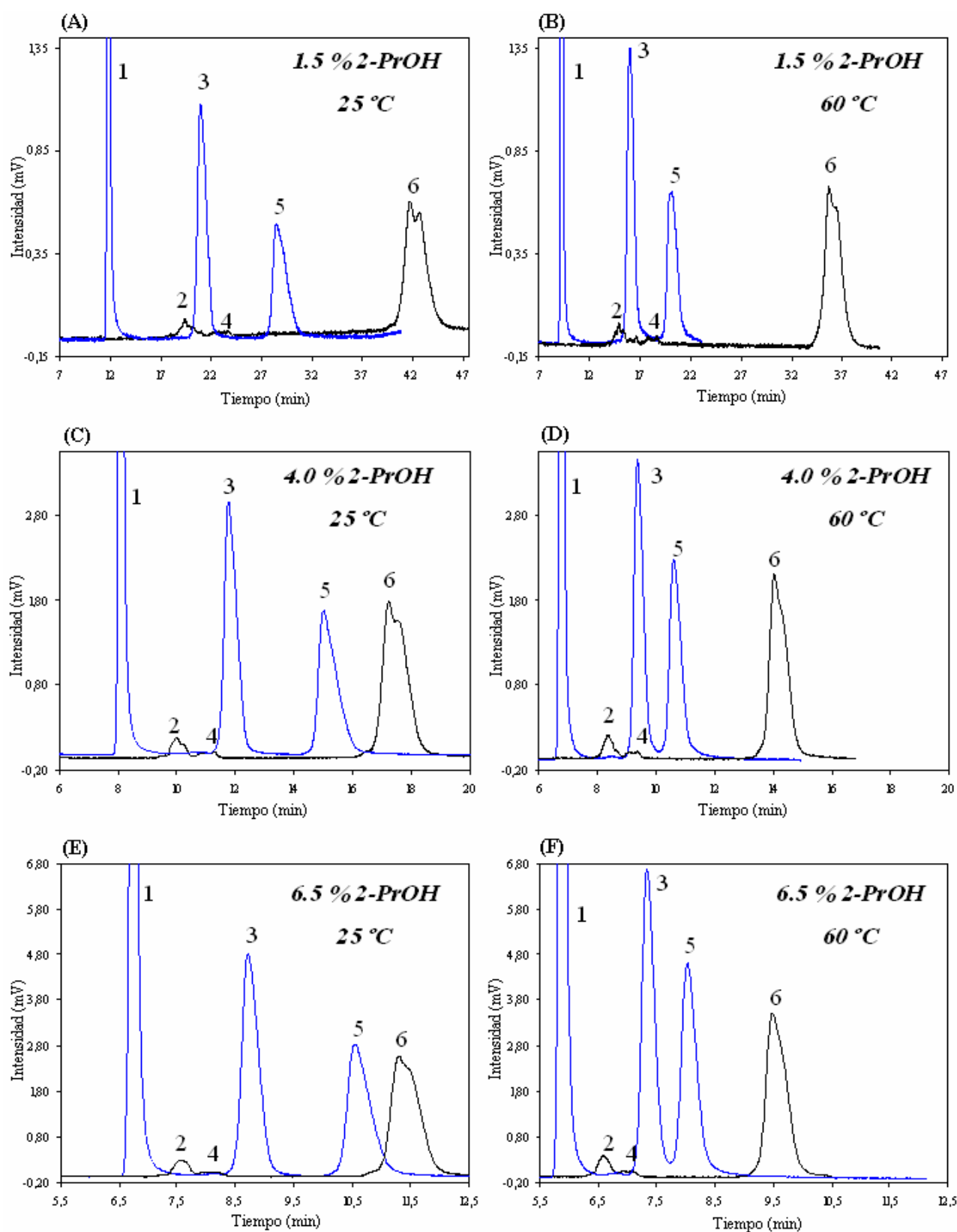
<b>N° de corrida</b>	<b>% 2-PrOH</b>	<b>T (°C)</b>	<b>FR (ml/min)</b>	<b>t<sub>0</sub></b>	<b>t<sub>TMP</sub></b>	<b>t<sub>2-NP (I)</sub></b>	<b>t<sub>2-NP (II)</sub></b>	<b>t<sub>4-NP1EO</sub></b>	<b>t<sub>4-NP2EO</sub></b>	<b>t<sub>4-NP</sub></b>
<b>1</b>	1,5	25,0	0,85	3,90	11,77	19,50	23,82	21,03	28,49	42,14
<b>2</b>	1,5	42,5	0,85	3,83	10,22	16,08	19,87	17,74	22,43	36,00
<b>3</b>	1,5	60,0	0,85	3,78	9,27	14,94	18,71	16,04	20,09	35,68
<b>4</b>	2,0	33,8	0,66	4,97	12,68	18,59	22,32	21,21	27,23	38,27
<b>5</b>	2,0	42,5	1,23	2,64	6,46	9,39	11,31	10,75	13,50	19,43
<b>6</b>	2,0	51,3	0,66	4,90	11,31	16,40	19,85	18,65	22,87	34,67
<b>7</b>	4,0	25,0	0,85	3,87	7,79	9,51	10,57	10,97	13,43	15,60
<b>8</b>	4,0	33,8	0,29	11,29	22,32	27,52	30,89	32,02	39,25	46,50
<b>9</b>	4,0	33,8	1,41	2,31	4,64	5,75	6,41	6,64	8,18	9,55
<b>10</b>	4,0	42,5	0,85	3,81	7,31	8,93	10,02	10,35	12,30	14,97

**Tabla 5** (cont.)

<b>11</b>	4,0	42,5	0,85	3,80	7,23	8,75	9,79	10,08	11,89	14,54
<b>12</b>	4,0	51,3	0,29	2,27	4,29	5,28	5,89	6,03	7,06	8,75
<b>13</b>	4,0	51,3	1,41	11,09	20,43	25,12	28,08	28,42	32,59	41,63
<b>14</b>	4,0	60,0	0,85	3,76	6,78	8,36	9,37	9,37	10,60	14,02
<b>15</b>	6,0	33,8	1,04	3,13	5,47	6,43	6,69	7,26	8,74	9,34
<b>16</b>	6,0	42,5	0,47	6,88	11,61	13,12	14,23	15,10	17,42	19,56
<b>17</b>	6,0	51,3	1,04	3,08	5,10	5,77	6,24	6,58	7,45	8,56
<b>18</b>	6,5	25,0	0,85	3,86	6,74	7,57	8,20	8,73	10,56	11,31
<b>19</b>	6,5	42,5	0,85	3,80	6,28	7,03	7,57	7,96	9,08	10,22
<b>20</b>	6,5	60,0	0,85	3,74	5,89	6,59	7,08	7,34	8,03	9,48

---

T = temperatura del calefactor de columna, FR = caudal de fase móvil,  $t_0$  = tiempo muerto (en min)



**Figura 9:** Cromatogramas superpuestos de la mezcla de 5 mg/l de TMP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, y la solución de 5 mg/l de t-NP. La numeración de los picos indica: (1) TMP, (2) 2-NP (grupo I), (3) 4-NP1EO, (4) 2-NP (grupo II), (5) 4-NP2EO, (6) 4-NP. La composición de la fase móvil y la temperatura del calefactor están indicadas en la figura. El caudal es de 0,85 ml/min.



### 3.1.2.b.ii. Desarrollo del modelo

Jandera y colaboradores [Jandera, 1988; Jandera *et al.*, 1990; Jandera *et al.*, 1998] estudiaron el comportamiento cromatográfico de co-oligómeros sobre columnas de fase normal y elución con fases móviles binarias constituidas por dos solventes orgánicos de polaridades sustancialmente diferentes. Ellos encontraron que la dependencia de la retención de los co-oligómeros con la fracción molar o de volumen del solvente más polar ( $\varphi$ ), puede ser descripta en muchos casos a través de la siguiente ecuación:

$$\log k = a - m \log \varphi \quad \text{Ec. (4)}$$

donde las constantes  $a$  y  $m$  dependen de la superficie específica y de la actividad de la fase estacionaria, así como de la fuerza del eluyente y de las propiedades del soluto, siendo  $m$  siempre un valor positivo. Este modelo ha sido empleado con éxito por los autores mencionados, para describir la retención de oligo-estirenos [Jandera, 1988], alcoholes grasos etoxilados [Jandera *et al.*, 1998] y NPnEO con longitudes nominales de la cadena etoxilada ( $n$ ) entre 1,5 y 20 [Jandera, 1988; Jandera *et al.*, 1990]. Emplearon en esos casos fases fijas de sílica-gel, y fases enlazadas diol-, nitrilo- y amino-; eluyeron con mezclas de 1,4-dioxano, 1- ó 2-PrOH y etanol/ $n$ -heptano, así como también con mezclas 1- ó 2-PrOH/ $n$ -hexano.

Por el otro lado, la contribución de la temperatura a la retención de los analitos en un proceso cromatográfico que involucra la distribución entre las fases móvil y estacionaria, está gobernada por la constante de equilibrio de distribución de las moléculas de soluto entre ambas fases. Dicha constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) está asociada con los cambios en la energía libre ( $\Delta G^\circ$ ), la entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y la entropía ( $\Delta S^\circ$ ) involucrados en la transferencia de un mol de analito desde la fase móvil hacia la fase fija, de la siguiente manera [Hatsis y Lucy, 2001; Cho *et al.*, 2003; Greibrokk y Andersen, 2003; Vanhoenacker y Sandra, 2005]:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ = -R T \ln K_{eq} \quad \text{Ec. (5)}$$

El factor de retención ( $k$ ) se define como:

$$k = K_{eq} \Phi \quad \text{Ec. (6)}$$

donde  $\Phi$  es la relación de fases de la columna.

A partir de las ecuaciones 5 y 6, la dependencia de  $k$  con la temperatura puede ser descripta por la siguiente expresión:

$$\ln k = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R + \ln \Phi \quad \text{Ec. (7)}$$

donde  $T$  es la temperatura absoluta y  $R$  es la constante universal de los gases. Si  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  no cambian apreciablemente con la temperatura (lo cual usualmente se cumple dentro de un intervalo de temperaturas pequeño), entonces la ecuación 7 puede ser re-escrita como:

$$\ln k = b - c (1/T) \quad \text{Ec. (8)}$$

donde  $b$  y  $c$  son parámetros constantes para cada compuesto en particular. De acuerdo con esto, cuando se representa  $\ln k$  en función de  $1/T$  (*gráfico de van't Hoff*), debería obtenerse una línea recta. La pendiente,  $-c = -\Delta H^\circ / R$ , permitirá una estimación de la contribución entálpica a la retención cromatográfica. Dicha contribución puede ser positiva o negativa, para procesos de retención endotérmicos o exotérmicos, respectivamente [Hatsis y Lucy, 2001; Greibrokk y Andersen, 2003].

Algunos trabajos reportados en la literatura se llevaron a cabo con el objeto de comparar el efecto de variaciones en la fuerza del eluyente con el de variaciones en la temperatura de la columna, especialmente en sistemas de fase inversa. Según esos estudios, el efecto de la fuerza del solvente sobre la retención de los solutos suele ser más marcado que el efecto de la temperatura [Greibrokk y Andersen, 2003]. Por eso, al pensar en el desarrollo de un método, creímos que explorar de qué forma se complementan la fuerza del eluyente y la temperatura de la columna podría resultar de mayor utilidad que hacer comparaciones directas de cada efecto por separado.

Se pensó que una combinación apropiada de las ecuaciones 4 y 8 podía resultar adecuada para describir la retención de cada analito a lo largo del espacio experimental investigado [Jandera, 1988; Jandera *et al.*, 1990].

El modelo más simple era el siguiente:

$$\ln k = A + B \ln (\% \text{ 2-PrOH}) + C (1/T) \quad \text{Ec. (9)}$$

donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son parámetros constantes para cada compuesto.

El arreglo experimental utilizado permitía un control preciso de la temperatura exterior de la columna, a través del uso de un horno especialmente diseñado para columnas de HPLC. De esta forma, y a pesar de que el reservorio de fase móvil se encontraba a temperatura ambiente, luego de un tiempo de acondicionamiento apropiado se alcanzaban condiciones estacionarias de temperatura en el seno de la columna. Dado que la única temperatura que éramos capaces de medir era la temperatura del horno, ése es el parámetro que podíamos introducir en un modelo empírico para  $\ln k$ . Para caudales de eluyente bajos, puede asumirse razonablemente que las temperaturas externa e interna de la columna serán comparables. Sin embargo, una reconocida ventaja de emplear altas temperaturas en HPLC es la posibilidad de aplicar caudales elevados sin pérdida de eficiencia [Vanhoenacker y Sandra, 2005] y, por ello, se incluyó en este trabajo al caudal de fase móvil como una variable experimental. Aún cuando no se espera que los factores de retención sean función de la velocidad de la fase móvil [Engelhardt, 1979], sí podría esperarse que ocurriera una nivelación de la respuesta cromatográfica a la temperatura del horno, ante la aplicación de caudales elevados. De acuerdo con esto, se agregó a la ecuación 9 un término que tuviera en cuenta los efectos de interacción entre el caudal (FR) y la temperatura del calefactor, con el objeto de evaluar su significado estadístico, resultando en la ecuación 10:

$$\ln k = A + B \ln (\% \text{ 2-PrOH}) + C (1/T) + D (\text{FR}) (1/T) \quad \text{Ec. (10)}$$

Los factores de retención experimentales, colectados a partir de las corridas detalladas en la Tabla 5, se utilizaron para el cálculo de los coeficientes del modelo por análisis de regresión lineal. Los intervalos de confianza obtenidos para cada compuesto individual denotaron fuertes influencias de los tres primeros términos, pero un efecto estadísticamente no significativo del término de interacción caudal-temperatura. Eso demostró que, al menos dentro de los límites experimentales explorados, la introducción de la temperatura del horno en una ecuación para  $\ln k$  tenía un sentido termodinámico.

Así, se recalcularon las constantes  $A$ ,  $B$  y  $C$  para la ecuación 9. Como sólo tres términos resultaron significativos en el modelo, del total de experimentos en la Tabla 5 se utilizaron solamente catorce para el cálculo de los coeficientes; estos fueron las corridas 1-4, 6, 7, 10, 11, 14, 15 y 17-20. Las seis corridas restantes se utilizaron para la evaluación de los errores de predicción.

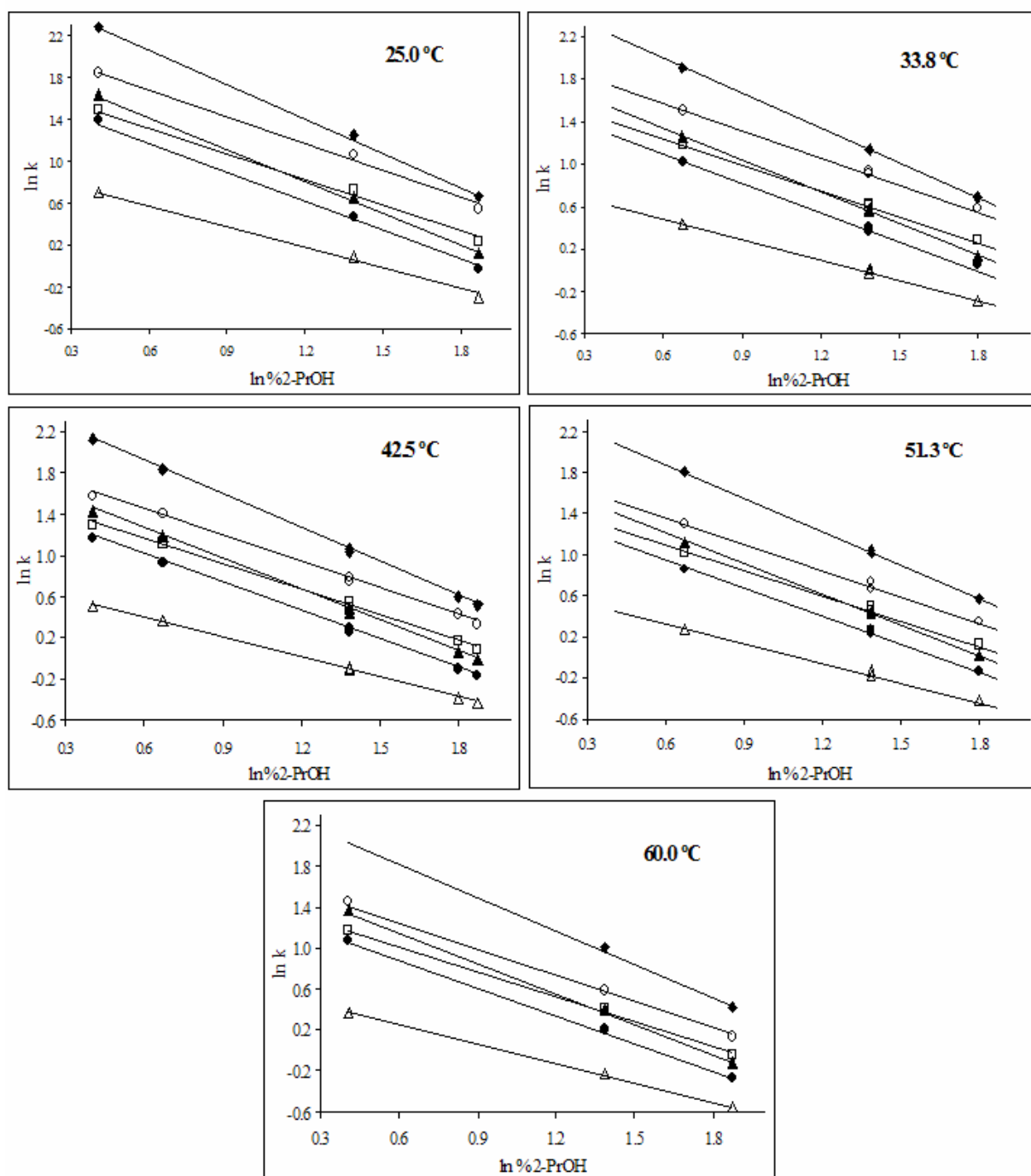
Los coeficientes obtenidos para el modelo bi-variante propuesto se presentan en la Tabla 6, junto con los *errores típicos* correspondientes.

**Tabla 6.** Coeficientes de la ecuación 9 para cada analito.

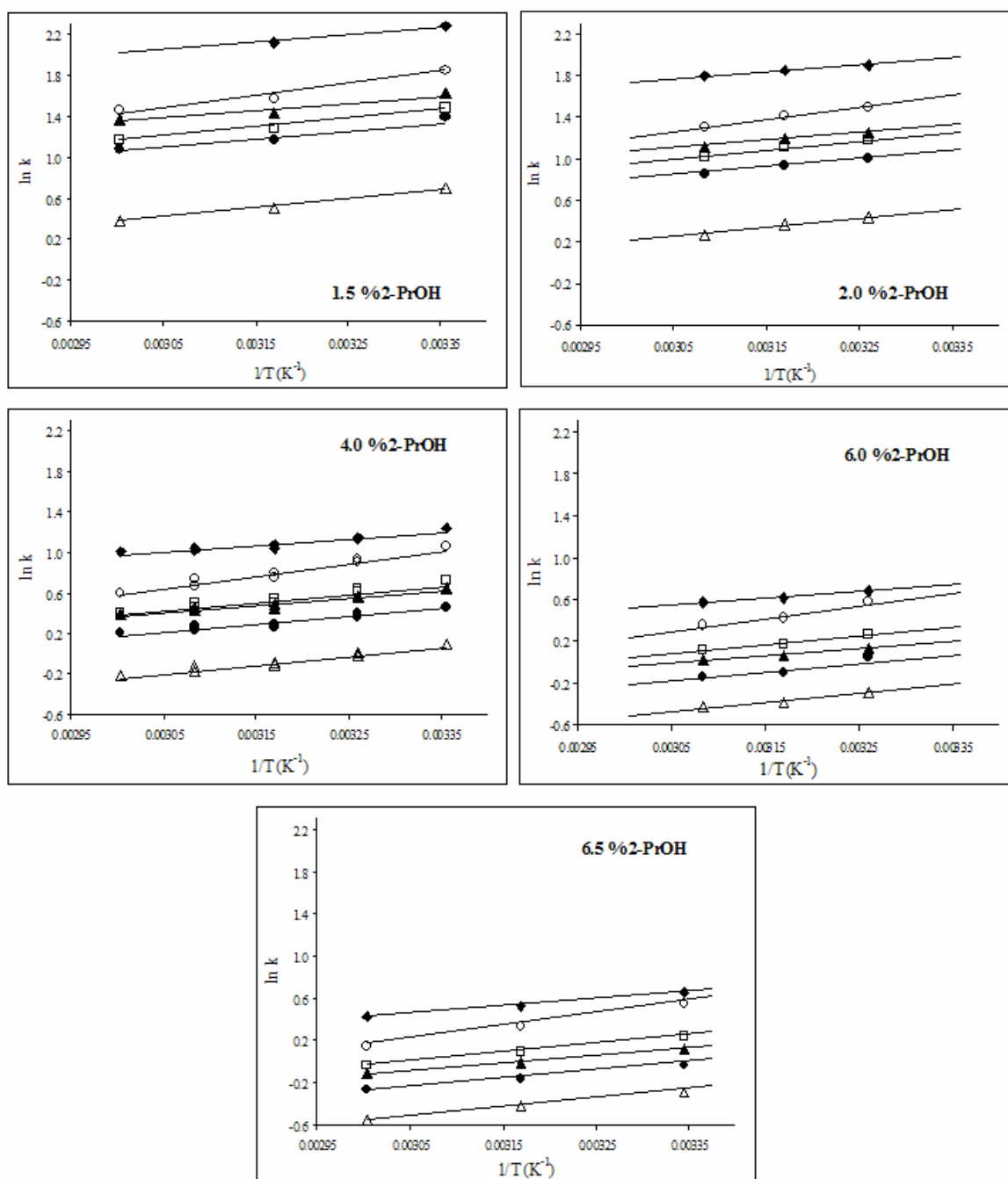
	TMP	2-NP (I)	2-NP (II)	4-NP1EO	4-NP2EO	4-NP
<b>A</b>	-1,9 ( $\pm 0,1$ )	-0,96 ( $\pm 0,04$ )	-0,364 ( $\pm 0,009$ )	-1,06 ( $\pm 0,03$ )	-1,85 ( $\pm 0,06$ )	0,452 ( $\pm 0,009$ )
<b>B</b>	-0,64 ( $\pm 0,02$ )	-0,91 ( $\pm 0,03$ )	-1,00 ( $\pm 0,03$ )	-0,82 ( $\pm 0,03$ )	-0,86 ( $\pm 0,04$ )	-1,09 ( $\pm 0,03$ )
<b>C</b>	857 ( $\pm 91$ )	798 ( $\pm 161$ )	706 ( $\pm 125$ )	854 ( $\pm 125$ )	1207 ( $\pm 167$ )	675 ( $\pm 132$ )

A continuación, se calcularon los valores de  $\ln k$  con la ecuación 9. La estimación de los errores de predicción se hizo a través del cálculo de *errores de predicción cuadráticos medios* (RMSPE), y dieron valores entre 2 y 5% para  $\ln k$  y entre 0,7 y 2%.

En las figuras 10 y 11 se presentan gráficos de  $\ln k$  como función de  $\ln (\% 2\text{-PrOH})$  y  $1/T$ . En ellos, se representaron conjuntamente los logaritmos naturales de los factores de retención calculados (*líneas rectas*) y los experimentales (*puntos*). Cabe resaltar que en dichos gráficos los resultados experimentales fueron colectados con diferentes caudales de eluyente (ver Tabla 5), y aún así la dependencia lineal de  $\ln k$  con  $\ln (\% 2\text{-PrOH})$  y  $1/T$  es clara, con sólo una pequeña dispersión en los datos.



**Figura 10:** Gráfico de  $\ln k$  en función de la composición del eluyente, para diferentes temperaturas de la columna. Los resultados experimentales para cada compuesto, representados por puntos, son: ( $\blacklozenge$ ) 4-NP, ( $\circ$ ) 4-NP2EO, ( $\square$ ) 4-NP1EO, ( $\blacktriangle$ ) 2-NP (grupo II), ( $\bullet$ ) 2-NP (grupo I), ( $\triangle$ ) TMP. Los valores de  $\ln k$  calculados con la Ec. 9 para cada analito están representados por líneas rectas. Las temperaturas del horno están indicadas en la figura. Caudales de fase móvil: 0,29 – 1,41 ml/min (ver Tabla 5).



**Figura 11:** Gráfico de  $\ln k$  en función de  $1/T$  para diferentes composiciones de eluyente. Los resultados experimentales para cada compuesto, representados por puntos, son: ( $\blacklozenge$ ) 4-NP, ( $\circ$ ) 4-NP2EO, ( $\square$ ) 4-NP1EO, ( $\blacktriangle$ ) 2-NP (grupo II), ( $\bullet$ ) 2-NP (grupo I), ( $\triangle$ ) TMP. Los valores de  $\ln k$  calculados con la Ec. 9 para cada analito están representados por líneas rectas. Las composiciones de la fase móvil están indicadas en la figura. Caudales de fase móvil: 0,29 – 1,41 ml/min (ver Tabla 5).

En lo que concierne al comportamiento cromatográfico, es evidente una marcada reducción en la retención de todos los compuestos estudiados para proporciones crecientes de 2-PrOH en la fase móvil. Esto puede verse en las marcadas pendientes de las rectas en la Figura 10, y también en los valores de las ordenadas al origen en la Figura 11, los cuales disminuyen sustancialmente para fuerza del eluyente creciente.

Por otra parte, todos los compuestos estudiados exhibieron un comportamiento exotérmico, esto es, disminución de la retención con el aumento de la temperatura. Esto coincide con resultados obtenidos por Cho y col. en HPLC de fase normal [Cho *et al.*, 2003], quienes habían observado un comportamiento exotérmico para la retención de poli-oxietilenos de alta y baja masa molecular sobre columnas de amino-sílice y elución con mezclas acetonitrilo/agua. También Vanhoenacker y Sandra [Vanhoenacker y Sandra, 2005] habían encontrado un comportamiento exotérmico para oligómeros de octilfenol separados por HPLC de fase normal; en ése caso, notaron una reducción neta en los tiempos de retención de todos los oligómeros con el aumento de la temperatura, utilizando una columna de sílice y una fase móvil de acetonitrilo/agua.

En este trabajo, los cambios de entalpía estimados a partir del parámetro  $C$  de la ecuación 9 resultaron  $-6 \text{ kJ mol}^{-1}$  para 2-NP (II) y 4-NP, y  $-7 \text{ kJ mol}^{-1}$  para TMP, 2-NP (I) y 4-NP1EO. Significativamente mayor que los demás, el cambio de entalpía para la retención de 4-NP2EO resultó de  $-10 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Los valores de entalpía encontrados para este sistema de fase normal son algo menores que los que se han observado usualmente en sistemas de fase reversa. Estos últimos oscilan entre  $-10$  y  $-15 \text{ kJ mol}^{-1}$  para moléculas pequeñas, y son típicamente mayores para moléculas más grandes [Greibrokk y Andersen, 2003].

### **3.1.2.b.iii. Cambios en la selectividad**

La selectividad de la separación para un par de picos puede ser evaluada fácilmente midiendo  $\ln \alpha$  como la distancia entre las líneas rectas definidas por  $\ln k$  de cada compuesto individual. En este

sentido, pueden extraerse algunas conclusiones a partir de las figuras 10 y 11, las cuales pueden a su vez completarse con la observación de los cromatogramas de la figura 9.

En primer lugar, para el par de compuestos TMP / 2-NP (I) la selectividad disminuye a medida que aumenta la fuerza del eluyente, y resulta prácticamente independiente de la temperatura de la columna. Aún así, es siempre lo suficientemente alta como para mantener la resolución completa de estos analitos a medida que tienen lugar las variaciones de composición del eluyente y de temperatura. Este hecho hace que pueda considerarse al TMP una buena sustancia para ser utilizada como estándar interno en separaciones analíticas de *t*-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO.

Por el contrario, los otros grupos de compuestos pueden verse seriamente afectados. En el caso de 2-NP (II) / 4-NP1EO, el par sufre una inversión en el orden de elución. Esto tiene lugar para composiciones de eluyente que, para temperaturas de columna crecientes, aumentan de 2,9 a 3,9% de 2-PrOH. Cuando 2-NP (II) eluye más tarde que 4-NP1EO (lo que ocurre en la zona de concentraciones de 2-PrOH bajas), la resolución de isómeros del grupo I de 2-NP es mayor. Por eso, es el grupo I de isómeros el que se solapa parcialmente con el 4-NP1EO (ver figura 9-A y B). Así, aún cuando la selectividad para la dupla 2-NP (II) / 4-NP1EO puede resultar satisfactoria, la separación en su conjunto se deteriora.

Para el par 4-NP1EO / 4-NP2EO, las pendientes de la dependencia de  $\ln k$  con  $\ln (\% \text{ 2-PrOH})$  resultaron prácticamente indistinguibles. Es decir, los cambios en la selectividad a partir de variaciones en la composición porcentual de la fase móvil fueron mínimos para este par de analitos. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de Jandera [Jandera, 1988]. El autor había observado que en series oligoméricas con unidades repetitivas pequeñas (como es el caso de la serie de los etoxilatos de nonilfenol), la selectividad entre oligómeros no depende de manera significativa de la concentración del solvente más polar (en nuestro caso el 2-PrOH); en cambio, se ve mucho más afectada por la naturaleza del solvente (por ejemplo, si se utilizara etanol en lugar de isopropanol). De esta forma, la selectividad no puede modificarse sustancialmente variando la proporción de solventes en la fase móvil binaria. En nuestro caso, las variaciones en la selectividad resultan más notorias a medida que se modifica la temperatura de la columna, aumentando su valor para temperaturas decrecientes.

Con respecto al par 4-NP2EO / 4-NP, la separación se pone en peligro a temperaturas bajas y concentraciones de 2-PrOH elevadas. El compuesto 4-NP2EO es el más sensible a variaciones en la temperatura de la columna, mientras que 4-NP es el menos afectado (ver Tabla 6). Al mismo



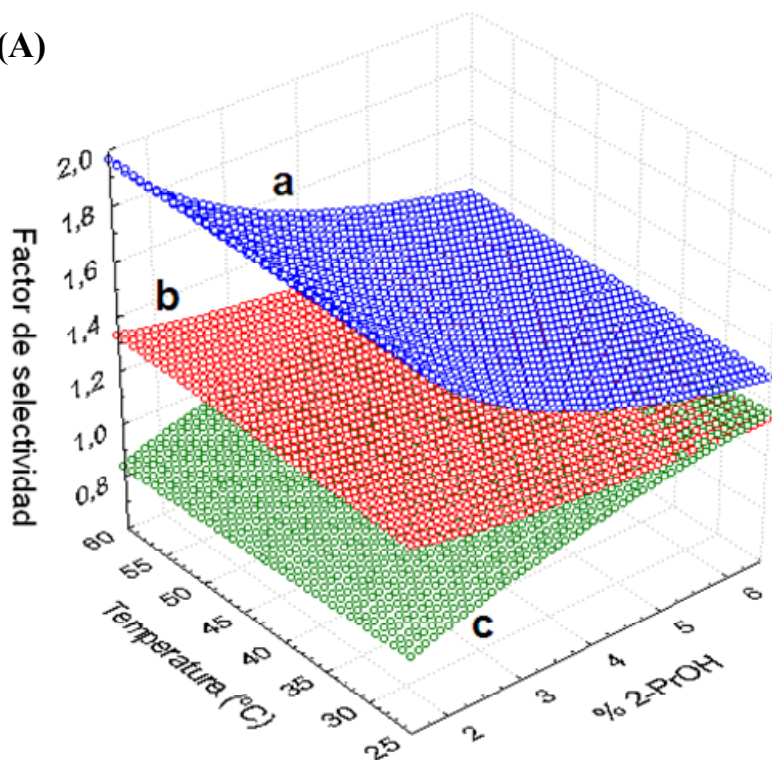
tiempo, la pendiente de la dependencia de la retención en función de la concentración de 2-PrOH es la mayor para 4-NP, y es sustancialmente diferente que la correspondiente a 4-NP2EO. Por estos motivos, esta es la pareja de analitos que resulta más afectada por las variaciones en las condiciones experimentales.

En la Figura 12 se utilizaron diagramas tridimensionales para describir los factores de selectividad como funciones combinadas de la concentración de 2-PrOH en la fase móvil y la temperatura de la columna. A modo de resumen, los aspectos más relevantes con respecto a las variaciones de selectividad pueden ser extraídos fácilmente de estos gráficos.

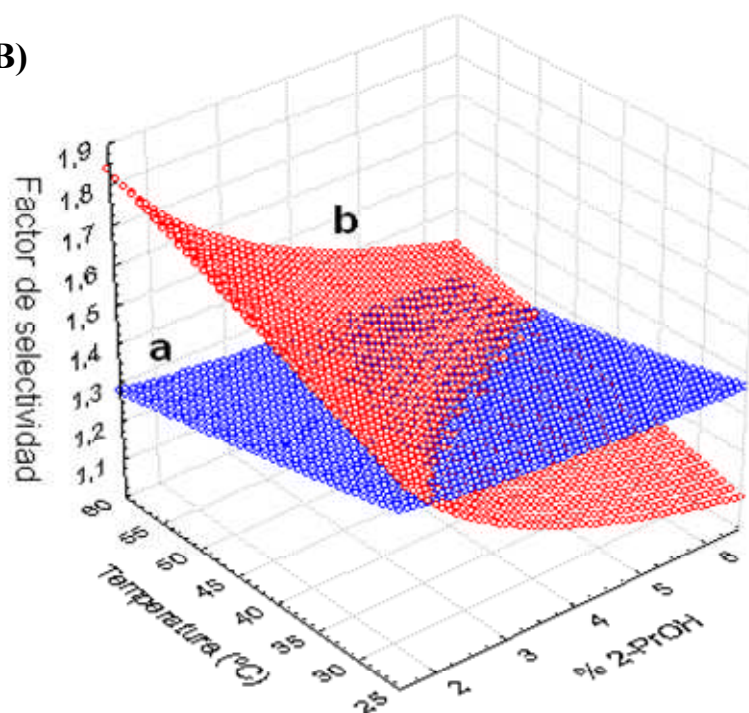
Por un lado, a medida que disminuye la fuerza del eluyente la selectividad de la separación mejora para los pares TMP / 2-NP (I) y 4-NP2EO / 4-NP. En el caso de 2-NP (II) / 4-NP1EO, los valores de  $\alpha$  menores que 1 implican que nos encontramos en la región donde ocurre un solapamiento parcial de los isómeros de 2-NP del grupo I con 4-NP1EO (el factor de selectividad para este par no está representado en la figura). En este caso no se re-atribuyó el orden de los picos en la fórmula de  $\alpha$  para mantener la convención usual de  $\alpha \geq 1$ , ya que para los cálculos de *deseabilidad* (ver en la próxima sección) es necesario mantener el valor menor que 1 para el par 2-NP (II) / 4-NP1EO, con el objeto de distinguir entre condiciones *deseables* e *indeseables* (cuando el orden de elución dentro de este par cambia, los otros isómeros de 2-NP co-eluyen con 4-NP1EO, y la separación en su conjunto se arruina). Para los pares 2-NP (I) / 2-NP (II) y 4-NP1EO / 4-NP2EO, la selectividad permanece esencialmente inalterable frente a cambios en la fuerza del eluyente.

Por el otro lado, cuando se eleva la temperatura de la columna hay un marcado aumento en la selectividad de la separación para la dupla 4-NP2EO / 4-NP, y una disminución algo más suave para el par 4-NP1EO / 4-NP2EO. Para el resto de los pares de analitos, los cambios de selectividad encontrados a raíz de variaciones en la temperatura fueron diminutos.

(A)



(B)



**Figura 12:** Factores de selectividad como funciones combinadas de la concentración de 2-PrOH en la fase móvil y la temperatura de la columna. Las superficies de respuesta corresponden a los siguientes pares de compuestos: (A): (a) 2-NP (grupo I) / TMP, (b) 2-NP (grupo II) / 2-NP (grupo I), (c) 4-NP1EO / 2-NP (grupo II), y (B): (a) 4-NP2EO / 4-NP1EO, (b) 4-NP / 4-NP2EO.

### 3.1.2.b.iv. Optimización de la separación

Un objetivo importante de esta parte del trabajo era ser capaces de predecir qué combinaciones de composición de eluyente y temperatura de columna permitirían obtener una resolución adecuada de analitos y estándar interno. Sin embargo, dado que los cambios en las variables experimentales afectaron la selectividad de manera diferente para los varios pares de compuestos, la selección de la zona de trabajo óptima no fue tan directa.

En el análisis de sistemas con múltiples respuestas, el cálculo de *funciones de deseabilidad* ayuda a encontrar el balance óptimo entre las variadas características de las respuestas. El análisis indica áreas en la región del diseño experimental en donde es probable que el experimento ofrezca resultados *deseables*, siendo el término *deseable* una función de las respuestas combinadas [Meyers y Montgomery, 1995; Wu y Hamada, 2000].

En el presente caso, los factores de selectividad predichos por el modelo para cada par de analitos  $i$  fueron calculados y transformados en valores de deseabilidad  $d_i$ , siendo  $0 \leq d_i \leq 1$  y definidos como:

$$d_i = [(\ln \alpha_i - A_i) / (B_i - A_i)]^\lambda, \text{ cuando } A_i \leq \ln \alpha_i \leq B_i$$

$$d_i = 1, \text{ cuando } \ln \alpha_i > B_i$$

$$d_i = 0, \text{ cuando } \ln \alpha_i < A_i \quad \text{Ec. (11)}$$

El parámetro  $A_i$  es un valor de  $\ln \alpha_i$  por debajo del cual la separación se considera inaceptable, y  $B_i$  es un valor de  $\ln \alpha_i$  por encima del cual la separación se considera excelente. La constante  $\lambda$  se utiliza para un ajuste fino de la forma y la escala de la *función de deseabilidad* ( $D$ ). Se eligió un valor de  $\lambda = 0,3$  para los cálculos de este trabajo.

La *función de deseabilidad* se calcula como el promedio geométrico de los valores individuales de deseabilidad  $d_i$ :

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot \dots \cdot d_m)^{1/m} \quad \text{Ec. (12)}$$

donde  $m$  es el número total de respuestas.

En el presente trabajo, se seleccionó:

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \cdot d_4)^{1/4} \quad \text{Ec. (13)}$$

donde los pares de analitos fueron: (1): TMP / 2-NP (I), (2): 2-NP (II) / 4-NP1EO, (3): 4-NP1EO / 4-NP2EO y (4): 4-NP2EO / 4-NP.

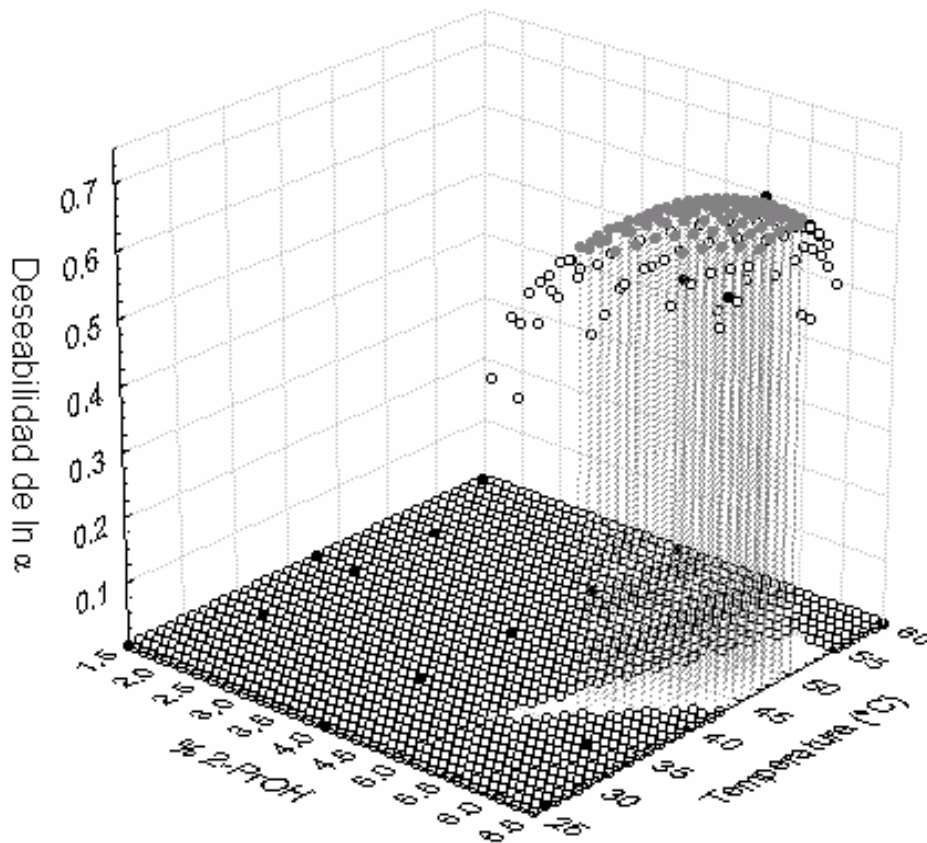
Así, cuando alguno de los  $d_i$  individuales se haga 0,  $D$  también resultará 0 y el resultado del experimento será globalmente inaceptable. Para todos los valores de  $D$  mayores que 0, los resultados se considerarán aceptables. Cuanto mayor sea  $D$ , más deseables serán los resultados.

Para determinar los valores de  $A_i$  y  $B_i$ , se tomó en cuenta que era de esperar (en base a la observación de los cromatogramas) que las condiciones aceptables estuvieran en una zona de temperaturas y concentraciones de 2-PrOH de medias a altas. Así, los anchos de los picos no variarían apreciablemente dentro de esa ventana, y podría obtenerse buenas estimaciones de los parámetros  $A_i$  y  $B_i$  considerando los valores de  $\ln \alpha_i$  para cada par de analitos, en las corridas experimentales en las que se había obtenido resolución en línea de base (para  $A_i$ ) y una excelente resolución (para  $B_i$ ).

De esta forma, se calcularon los  $d_i$  y la función  $D$  para los valores de  $\ln \alpha_i$  experimentales y para los predichos por el modelo.

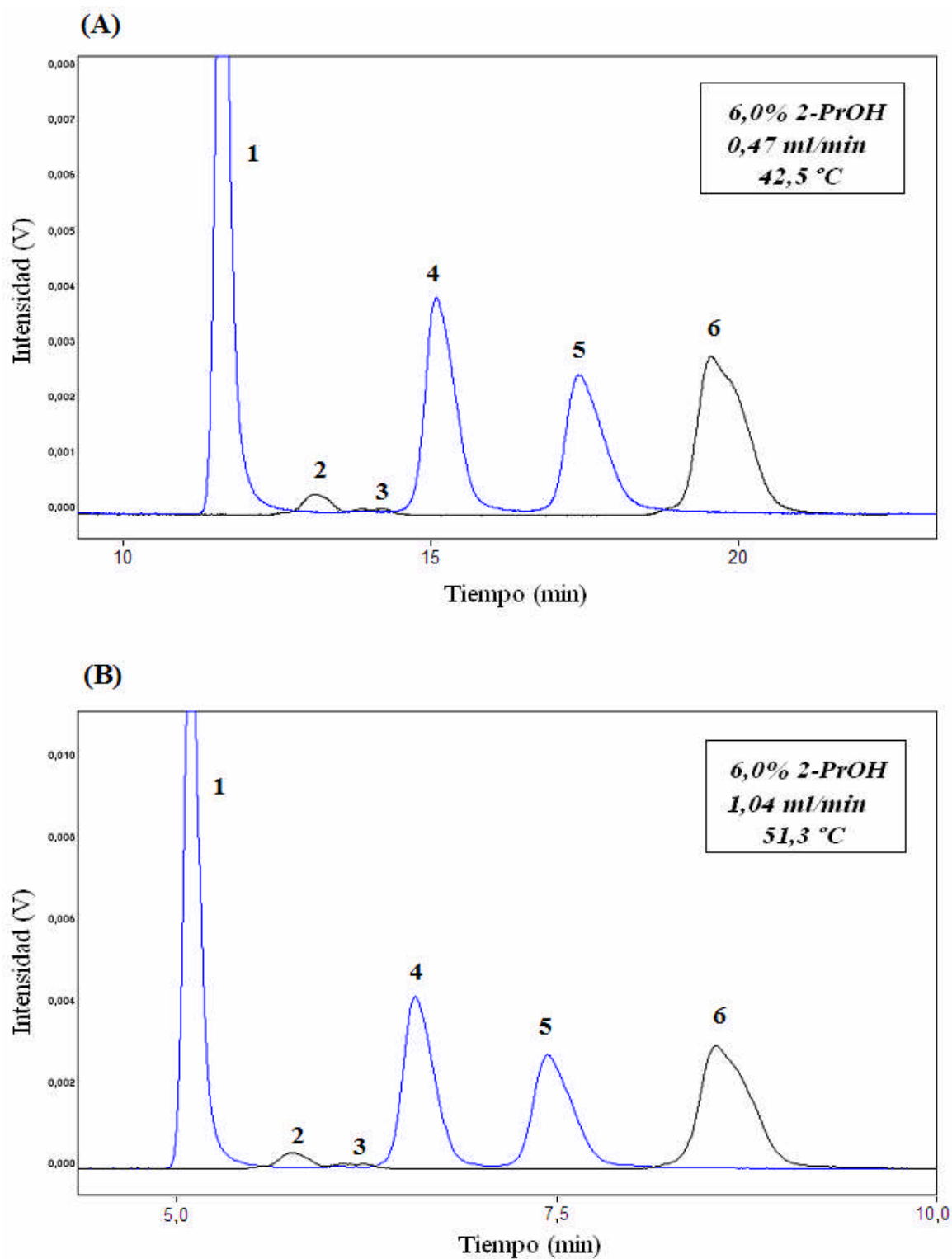
En la figura 13 están representados gráficamente los valores obtenidos para  $D$ , en función de la composición del eluyente y de la temperatura del calefactor.

En el gráfico puede visualizarse la existencia de una región restringida del espacio experimental donde la separación resulta aceptable ( $D \neq 0$ ). La mejor zona de trabajo está determinada por el máximo de la *función de deseabilidad*, proyectada con líneas grises en el gráfico.



**Figura 13:** Gráfico de la *función de desabilidad* ( $D$ ) en función de la composición del eluyente y la temperatura del calefactor. *Puntos blancos*: valores predichos por el modelo de la ecuación 9. *Puntos negros*: valores experimentales. *Puntos grises*: zona de  $D$  máxima (valores predichos por el modelo). Esta región está proyectada con líneas punteadas.

En la Figura 14 se muestran dos cromatogramas adquiridos bajo condiciones *deseables*. Las separaciones fueron realizadas con 6,0% 2-PrOH, 42,5 °C y 0,47 ml/min (Figura 6-A) y 6,0% 2-PrOH, 51,3 °C y 1,04 ml/min (Figura 6-B). Puede observarse en ambos casos que, efectivamente, en tiempos de corrida relativamente cortos se alcanzó la resolución completa de analitos y estándar interno.



**Figura 14:** Cromatogramas de una mezcla de TMP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, y de una solución de *t*-NP (todos 5 mg/l), registrados bajo condiciones *deseables*. Los números sobre los picos indican: (1) TMP, (2) 2-NP (grupo I), (3) 2-NP (grupo II), (4) 4-NP1EO, (5) 4-NP2EO, (6) 4-NP. La composición y el caudal de la fase móvil, y la temperatura del calefactor, se indican en la figura.

En resumen, la retención de todos los compuestos resultó descripta apropiadamente por medio de una ecuación sencilla. Se demostró que, dentro de los límites experimentales estudiados, el logaritmo natural de los factores de retención tiene una dependencia lineal tanto con el logaritmo natural de la concentración de 2-PrOH como con la recíproca de la temperatura. Se observó en todos los casos una marcada disminución de la retención al aumentar la fuerza de la fase móvil y una disminución de la retención menos marcada para temperaturas crecientes. También se encontró que, en este caso particular, es factible emplear caudales elevados para acortar los tiempos de análisis manteniendo las ventajas de trabajar a altas temperaturas, aún cuando el reservorio de eluyente no se encuentre termostatzado.

Se puso especial énfasis en investigar cómo pueden complementarse la fuerza del eluyente y la temperatura de la columna para mejorar la selectividad de la separación. Dado que las variables experimentales afectaban la selectividad de modos diferentes para los distintos pares de compuestos, la selección de la mejor zona de trabajo se llevó a cabo mediante el cálculo de *funciones de deseabilidad*. Se encontró así que, con la columna empleada, la separación simultánea de todos los compuestos de interés resultaba aceptable en una zona restringida del espacio experimental, la cual involucraba temperaturas sustancialmente superiores que la ambiente. De esta forma, quedó demostrada la relevancia de utilizar la temperatura de la columna como una herramienta en el desarrollo de métodos, especialmente cuando se utiliza elución isocrática.

### **3.2. ELUCIÓN CON GRADIENTE DE LOS POLI-ETOXILATOS**

En el contexto del trabajo en colaboración con el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular y el Centro de Investigación y Desarrollo en Ingeniería Ambiental del INTI, iniciado durante el período de los estudios con electroforesis capilar, se desarrolló un método para la separación de los oligómeros etoxilados componentes del NP10EO por HPLC. Se utilizó para ello la columna Pinnacle II empleada en los experimentos con elución isocrática.

### 3.2.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

En los sistemas de fase normal, los oligómeros individuales de derivados de poli-etilenglicol eluyen en orden de número de unidades etoxilo creciente. En el caso particular de AP $n$ EO separados sobre columnas de amino-sílice con fases móviles formadas por un  $n$ -alcano y un alcohol, se ha encontrado que los logaritmos de los factores de retención crecen de manera lineal con el número de unidades repetitivas de las moléculas (es decir, con  $n$ ) [Jandera, 1988]. Esto significa que los tiempos de retención de los etoxímeros crecen como  $10^n$  y es por eso que, si se desea discriminar tanto los metabolitos lipofílicos como los oligómeros superiores en tiempos de análisis razonables, es necesario aplicar elución con gradiente.

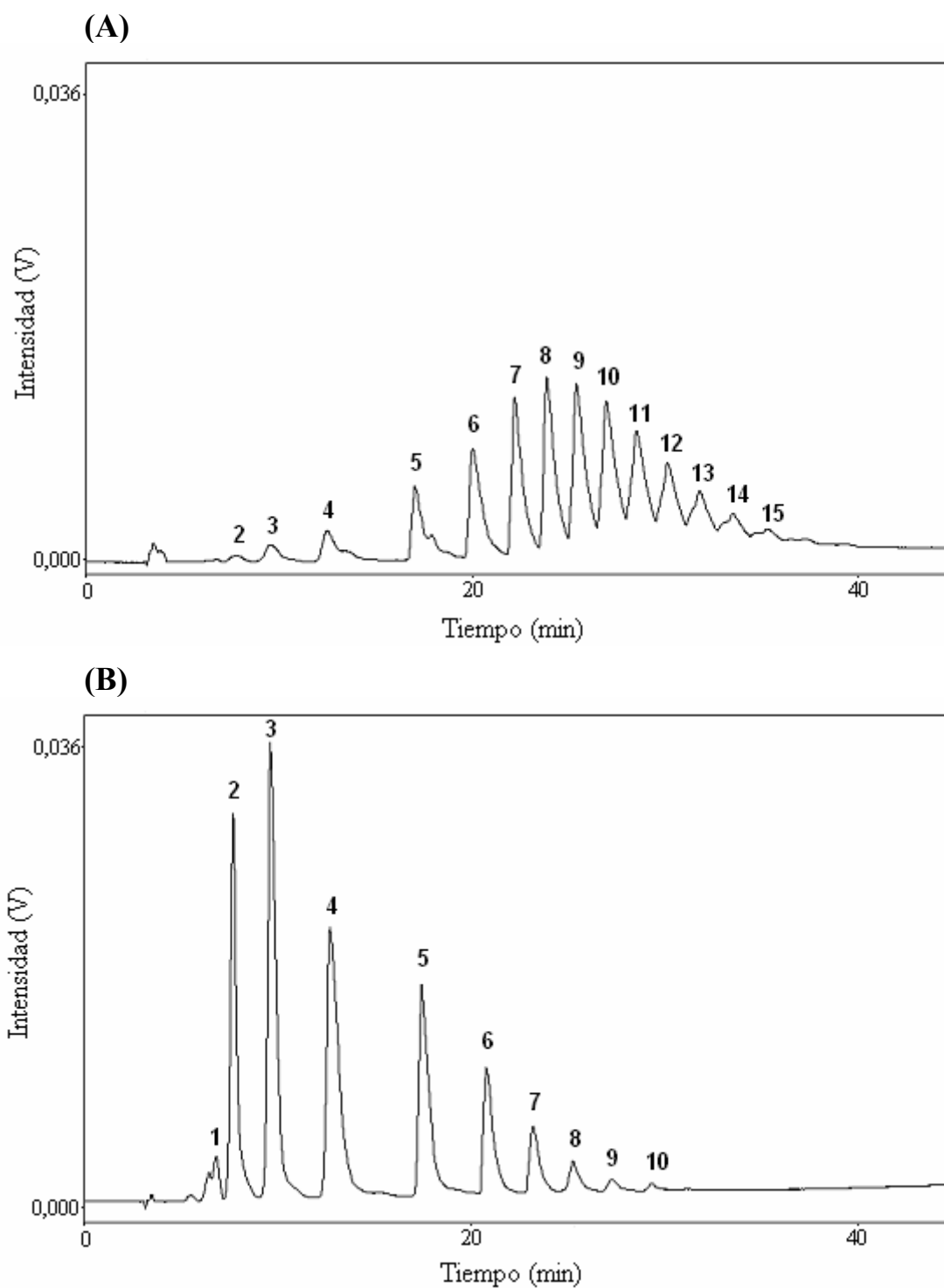
Tal como en la etapa anterior, se continuó trabajando con la mezcla de solventes *hexanos*/2-propanol. El programa a seguir debía consistir entonces de un comienzo en condiciones de baja concentración de 2-propanol para permitir una buena separación de los metabolitos estrogénicos, aumentando luego su proporción en la mezcla de modo de eluir los componentes más hidrofílicos del NP $n$ EO.

La elución con gradiente tiene ciertas peculiaridades. La línea de base puede verse seriamente deteriorada a causa de diferencias en las absorptividades de los componentes iniciales y finales de la fase móvil, dificultando la detección de cantidades pequeñas de los analitos [Rissler, 1996]. En nuestro caso, fue necesario utilizar un 2-propanol de mejor calidad que el que se utilizó para las corridas con elución isocrática (se cambió el de marca Sintorgan por el J.T. Baker), así como aplicar una velocidad de gradiente relativamente baja, para obtener una línea de base con deriva y perturbaciones mínimas. Por otra parte, y tal como se había planteado en los comienzos de los experimentos de HPLC, fue necesario desgasificar ambos solventes con He durante 10 min entre corridas.

El programa seleccionado fue el siguiente: 10 minutos de elución isocrática con 96% *hexanos* – 4% 2-propanol, luego un gradiente lineal hasta 50% *hexanos* - 50% 2-propanol en 32 minutos, y finalmente 6 minutos isocráticos con 100% 2-propanol. La etapa final con 2-propanol (100%) se agregó como un paso de lavado de la columna, con el objeto de evitar la aparición de picos fantasmas en las corridas subsiguientes. La temperatura de la columna se mantuvo en 50 °C y el caudal de fase móvil en 1,00 ml/min. En la Figura 15 se presentan cromatogramas obtenidos bajo dichas condiciones para el NP10EO empleado por los investigadores de INGEBI-INTI, y para un



producto comercial con un contenido nominal de 4 unidades de oxido de etileno (NP4EO). Como puede observarse en la figura, el programa de gradiente seleccionado permitió obtener una línea de base con una deriva aceptable, así como una buena discriminación de oligómeros con un número de hasta 17 gupos etoxilo en 40 minutos de corrida.



**Figura 15:** Cromatogramas de: (A) una solución de NP10EO 600 mg/l y (B) una solución de NP4EO 600 mg/l, ambas en ciclohexano:2-propanol (90:10). Los números sobre los picos indican

el número de unidades etoxilo ( $n$ ) en el oligómero de NP $n$ EO correspondiente. Programa de gradiente: 1) 96% A – 4% B (10 minutos); 2) gradiente lineal hasta 50% A - 50% B en 32 minutos; 3) 100% B (6 minutos). Solventes: A: *hexanos* y B: 2-propanol. Caudal: 1,00 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Volumen de inyección: 100  $\mu$ l. Temperatura de la columna: 50 °C.

En el caso de los poli-etoxilatos de alquilfenol la absorción molar en el UV es independiente de la longitud de cadena etoxilada, dado que la señal medida involucra exclusivamente la contribución del cromóforo aromático, que es el mismo en todas las moléculas. Esto significa que la intensidad de las señales en el ámbito 210-280 nm refleja la distribución molar de oligómeros (sólo hay que tener en cuenta que la absorción específica decrece con el número de unidades EO creciente debido a la reducción en la contribución relativa del cromóforo aromático a la masa total de la molécula) [Rissler, 1996]. Así, puede verse en la Figura 15 cómo para una misma masa de ambos tensioactivos inyectada, la distribución de picos es sustancialmente diferente: en el caso del NP4EO, como era de esperar, la mayor parte de la masa está distribuida entre las moléculas con 2 a 5 unidades EO, mientras que en el caso del NP10EO, la mayor proporción de moléculas contiene entre 6 y 12 unidades EO.

### **3.2.2. APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE BIO-DEGRADACIÓN**

El método desarrollado fue aplicado en el estudio de la degradación del nonilfenol poli-etoxilado con un promedio de 10 grupos etoxilo, en condiciones anaeróbicas y acoplada a la reducción de nitrato. El objetivo de la investigación era elucidar el rol de del nitrato como aceptor de electrones en la degradación del NP10EO. Se utilizó para ello, con ciertas modificaciones, las condiciones de operación de un ensayo de biodegradabilidad en batch (método de Zahn-Wellens) [ISO:9888, 1999].

Trabajos anteriores indican que la degradación aeróbica de los etoxilatos de nonilfenol ramificados, tanto por cultivos microbianos mixtos como puros, origina la formación de etoxímeros cortos (con  $1 < n < 4$ ), etoxicarboxilatos de nonilfenol (NP $n$ EC) y otras moléculas más solubles en agua como los etoxicarboxilatos con la cadena alquímica también oxidada a su forma ácida (CAPEC) [Field y Reed, 1996; John y White, 1998; Manzano *et al.*, 1999; Di Corcia *et al.*, 2000; Ferguson y

Brownawell, 2003]; todos los compuestos mencionados serían resistentes a bio-degradación ulterior. El grado de degradación anaeróbica es aparentemente más lento, pero procede un paso más para formar (y subsecuentemente acumular) nonilfenol [Salanitro y Diaz, 1995; Ejlertsson *et al.*, 1999; Ferguson y Brownawell, 2003]. Estos resultados sugieren que la transformación microbiana de los NP $n$ EO ocurre a través de diferentes caminos en ambientes óxicos y anóxicos [Ferguson y Brownawell, 2003]. Mientras que ambas condiciones ambientales pueden llevar a la desaparición de los homólogos superiores de NP $n$ EO mediante el acortamiento de la cadena etoxilada, sólo los ambientes anóxicos dan lugar a la desetoxilación completa de las moléculas. Dado que la degradación anaeróbica posterior no ha sido observada nunca, el nonilfenol representaría el producto de degradación final de los etoxilatos en condiciones anaeróbicas [Giger *et al.*, 1984; Ejlertsson *et al.*, 1999; Maguire, 1999]. En contraposición, varios estudios indican que la mineralización del nonilfenol es posible bajo condiciones aeróbicas [Ekelund *et al.*, 1993; Topp y Starratt, 2000]. En conjunto, todos estos resultados sugieren que se requeriría una alternación de condiciones redox para poder lograr la mineralización completa de los NP $n$ EO.

A pesar de la importancia ambiental del nitrato como aceptor de electrones, existen sólo unos pocos (y conflictivos) estudios sobre la degradación de AP $n$ EO en condiciones reductoras de nitrato [Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Mohan *et al.*, 2006], y la comprensión de los mecanismos de transformación anaeróbica de los NP $n$ EO en el ambiente se ha visto dificultada por la ausencia de evidencia clara sobre su dependencia con la presencia de dicho anión. Por eso, la importancia de este estudio residió en evaluar si el NP10EO es potencialmente bio-degradable bajo condiciones desnitrificantes. La cromatografía líquida constituyó la base para el análisis de los perfiles de degradación del tensioactivo.

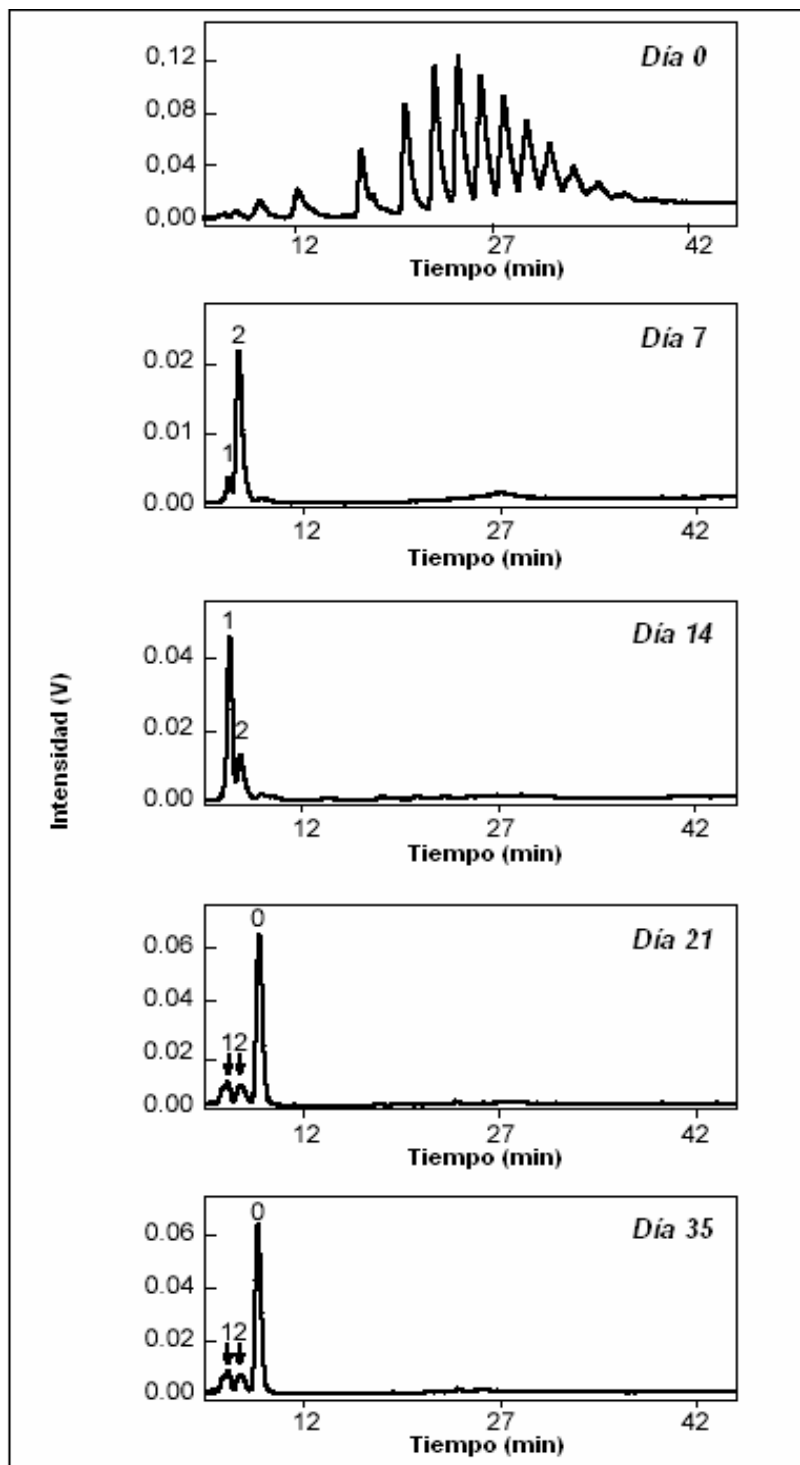
Los inóculos se obtuvieron de los reactores SCAS referidos en el Capítulo 2 de esta tesis. Una muestra compuesta a partir de los duplicados SCAS fue agregada a sendos bio-reactores batch, los cuales consistían de botellas color caramelo de 250 ml conteniendo medio mineral de acuerdo al método citado [ISO:9888, 1999]. Como única fuente de carbono orgánico se adicionó NP10EO en concentración de 300 mg/l. El oxígeno disuelto fue desplazado burbujando nitrógeno por 10 minutos, y se agregó nitrato de potasio en concentración final de  $10^{-3}$  mol/l. Paralelamente, se corrieron controles de actividad endógena (biomasa + medio mineral + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y de actividad fermentativa (biomasa + medio mineral + NP10EO), así como dos condiciones alternativas de aceptores de electrones, reemplazando el nitrato de potasio por las sales potásicas de sulfato y carbonato. Los reactores fueron sacrificados a diferentes tiempos de incubación para el análisis.

Alícuotas de 150 ml de los sobrenadantes de centrifugación se extrajeron inmediatamente sobre 0,5 g de fase sólida de C-18. La elución se realizó con 1 ml de acetato de etilo, el cual fue luego evaporado a sequedad con corriente de N<sub>2</sub>. Otras alícuotas de sobrenadante se utilizaron para seguir la desaparición de nitrato y la evolución de nitrito.

Los límites de detección de HPLC resultaron de alrededor de 4 mg/l para el NP10EO (como suma de oligómeros) y de 0,1 mg/l para NP, NP1EO y NP2EO. La presencia del tensioactivo o alguno de sus productos de degradación nunca fue detectada en los blancos. Los ensayos de recuperación de NP10EO se llevaron a cabo sometiendo las muestras de tiempo cero (es decir, al inicio de la incubación) al mismo proceso de preconcentración aplicado a las muestras a lo largo del tiempo, y mostraron una recuperación del 70% para la mezcla de oligómeros. La recuperación de los metabolitos lipofílicos se evaluó enriqueciendo agua *nanopure* con cantidades conocidas de los analitos, y estuvo entre 85 y 90% para cada uno de los compuestos.

La Figura 16 se preparó con corridas de muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo de 35 días de incubación en condiciones anóxicas y en presencia de nitrato. En ella puede observarse cómo la degradación del NP10EO evolucionó, finalmente, hacia la formación de NP como producto principal. A los 7 días de iniciado el experimento, el NP2EO aparecía como el producto mayoritario, y los etoxímeros superiores ya habían desaparecido casi por completo. Siete días más tarde, el metabolito predominante era el NP1EO. En 21 días de incubación, la especie prevaleciente fue el nonilfenol, y el perfil cromatográfico (con la presencia de pequeñas cantidades de los compuestos mono- y di-etoxilados) no cambió luego de 35 días.

La concentración de nitrato disminuyó en paralelo con la degradación del NP10EO, mientras que la de nitrito creció a partir del día 7 hasta un máximo en el día 21, en forma concurrente con la formación de NP. En el caso del experimento llevado a cabo en condiciones fermentativas, y en aquéllos en los que se emplearon aceptores de electrones alternativos, el perfil de oligómeros característico del NP10EO permaneció inalterable en 35 días de incubación. En otras palabras, bajo las condiciones empleadas en estos experimentos la degradación del NP10EO en ausencia de oxígeno molecular fue estrictamente dependiente de la presencia de nitrato.



**Figura 16:** Perfiles de HPLC de los sobrenadantes de los experimentos incubados anaeróbicamente en presencia de  $\text{KNO}_3$  10 mM. En los recuadros figuran los tiempos a los que fueron tomadas las muestras. Los números 1, 2 y 0 señalan los picos de 4-NP1EO, 4-NP2EO y 4-NP, respectivamente. Programa de gradiente: 1) 96% A – 4% B (10 minutos); 2) gradiente lineal hasta 50% A - 50% B en 32 minutos; 3) 100% B (6 minutos). Solventes: A: *hexanos* y B: 2-propanol. Caudal: 1,00 ml/min. Longitud de onda de detección: 277 nm. Volumen de inyección: 100  $\mu\text{l}$ . Temperatura de la columna: 50 °C.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la degradación anóxica de los NP $n$ EO puede proceder hacia la formación de NP en condiciones desnitrificantes y en presencia de la comunidad microbiana autóctona empleada. Dado que el NP es susceptible de degradación por bacterias aeróbicas especializadas, estos resultados presentan una base para el desarrollo de estrategias secuenciales de tratamiento biológico anóxico-aeróbico de efluentes que contienen polietoxilatos de alquilfenol.

### **3.3. DETERMINACIÓN DE OCTILFENOL EN PECERAS EXPERIMENTALES**

En esta etapa se estableció una colaboración con un grupo de investigación del Laboratorio de Embriología Animal perteneciente al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la FCEyN (UBA), el cual se encontraba estudiando los efectos estrogénicos del 4-*ter*-octilfenol (OP) en peces, empleando como modelo experimental un pez dulceacuícola autóctono, la chanchita *Cichlasoma dimerus*. En dichos estudios, se analizó el efecto de la exposición crónica a diferentes concentraciones de OP sobre aspectos reproductivos de larvas y adultos de la especie. Los ensayos realizados con estadios larvales y juveniles implicaron la exposición crónica a OP entre el día 14 y 100 de desarrollo, efectuando un recambio total del agua de ensayo cada 84 horas (diseño de exposición semiestático). En los experimentos con peces adultos, individuos sexualmente maduros fueron expuestos al xenoestrógeno durante 60 días, empleando la misma frecuencia de renovación del agua de ensayo.

Diversos autores han demostrado que la exposición a xenoestrógenos produce trastornos reproductivos en los peces. Las alteraciones documentadas incluyen inducción de la síntesis de vitelogenina en los machos (la vitelogenina es una proteína producida en el hígado de las hembras ovíparas por inducción del 17 $\beta$ -estradiol), así como anomalías testiculares, alteración de la espermatogénesis, inducción de intersexos, cambios en los niveles plasmáticos de gonadotrofinas y esteroides sexuales, y descenso de la fecundidad y de la tasa de eclosión [Jobling *et al.*, 1996; Gronen *et al.*, 1999; Giesy *et al.*, 2000; Kinnberg *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Van den Belt *et al.*, 2001; Gray y Metcalfe, 1997; Kinnberg *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003]. En la presente

investigación, se analizó el efecto de la exposición a OP sobre el proceso de diferenciación sexual (en el caso de las larvas), mientras que en el caso de los peces adultos se emplearon como parámetros finales de evaluación la presencia de vitelogenina en plasma y mucus superficial y las alteraciones histológicas de las gónadas.

Ciertos antecedentes indicaban que la concentración de OP en el agua de ensayo podía disminuir con el tiempo [Kinnberg *et al.*, 2000], resultando en concentraciones de exposición efectivas menores que las concentraciones nominales ( $C_0$ ). Dada la relevancia que la relación entre la concentración del contaminante y la magnitud de los efectos tiene, era necesario seguir cuantitativamente la evolución temporal de la concentración del xenobiótico en los acuarios. En este contexto, se desarrolló y se aplicó un método de extracción en fase sólida seguido del análisis por HPLC en fase inversa acoplada a detección de fluorescencia molecular, para determinar las concentraciones reales de OP en el agua de los recipientes de ensayo a lo largo de los experimentos.

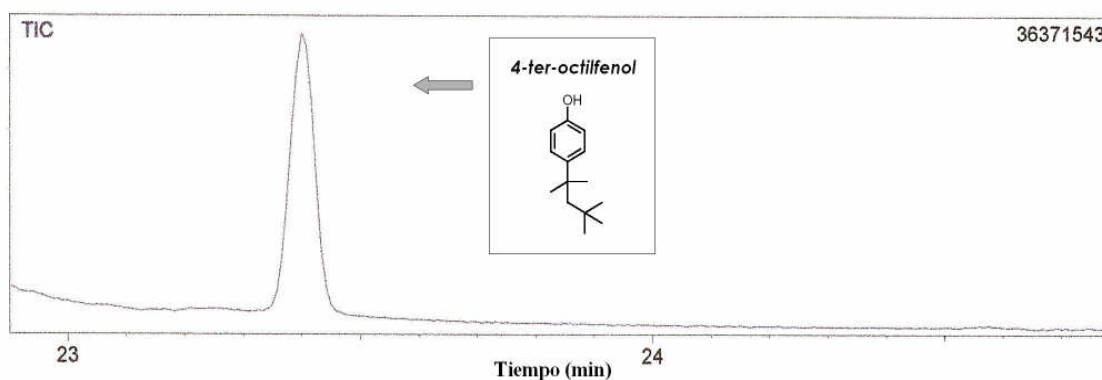
### **3.3.1. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA**

En base a los trabajos reportados por Ahel y Giger [Ahel y Giger, 1985-*a*; Ahel y Giger, 1985-*b*], la separación cromatográfica se encaró utilizando una columna de octil-sílice (C-8) de dimensiones 250 x 4,6 mm y tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$  (Phase Separations, UK). Los mencionados autores separaban octil- y nonilfenol a partir de muestras acuosas en unos 6 minutos, empleando una columna de C-8 de dimensiones similares y elución con una mezcla metanol:agua de proporción 80:20, a un caudal de 0,5 ml/min. Se utilizó en esta primera etapa del desarrollo detección UV a 277 y 230 nm, como paso previo a la incorporación de la detección de fluorescencia.

En nuestro caso, cuando la elución se realizó con una mezcla de esas mismas proporciones y a un caudal de 0,8 ml/min, el OP eluyó antes de los 10 minutos pero se obtuvo un pico muy ancho, desdoblado, que comenzaba a aparecer pegado al pico del solvente ( $t \sim 4$  min) y terminaba de salir aproximadamente a los 9 minutos. Se decidió entonces evaluar el uso de otro tipo de fase estacionaria, y se pasó a trabajar con una columna de octadecil-sílice (Prevail C-18, 150 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , Alltech, USA). Empleando las mismas condiciones de composición y caudal de fase móvil, los resultados fueron muy similares a los obtenidos con la columna de C-8:

un pico muy asimétrico que comenzaba a eluir tempranamente, pero que se desdoblaba y terminaba de eluir mucho más tarde.

El hecho presenciado, repetido para las dos fases estacionarias de diferente hidrofobicidad, hizo sospechar acerca de la pureza del compuesto utilizado como estándar de 4-*ter*-octilfenol. A diferencia de lo que ocurre con el nonilfenol, que aparece como una mezcla técnica de isómeros con diferentes ramificaciones de la cadena alquílica, tanto los poli-etoxilatos de octilfenol como el derivado fenólico se comercializan como productos compuestos por un único isómero, el *para*-1,1,3,3-tetrametilbutilfenol o 4-*ter*-octilfenol. Sin embargo, la apariencia de los cromatogramas de HPLC hizo dudar de que se encontrara presente una única sustancia, y se decidió evaluar la pureza del estándar por medio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Bajo las mismas condiciones de GC-MS puestas a punto para la determinación de nonilfenol (ver Cap. 4 de esta tesis), se corrió una solución del producto bajo sospecha en concentración 100 mg/l. Se obtuvo como resultado un cromatograma con un único pico muy intenso, que fue identificado unívocamente por la biblioteca espectral del instrumento como 4-*ter*-octilfenol. La ausencia de un patrón de picos isoméricos, o de cualquier otra sustancia que pudiera ser detectada a través de una técnica de elevada sensibilidad como la empleada, condujo a la conclusión de que se estaba trabajando con un estándar de alta pureza. En la Figura 17 se muestra el cromatograma de GC-MS obtenido, junto con una representación de la molécula del analito.



**Figura 17:** Cromatograma de GC-MS de OP 100 mg/l en metanol

Se pensó entonces que las dificultades encontradas podían atribuirse a la lipofilidad elevada del analito y que era necesario, por consiguiente, continuar la búsqueda de las condiciones de HPLC que permitieran obtener un pico con forma adecuada para la identificación y la cuantificación del OP. Se decidió examinar a continuación un tipo de columna de características diferentes, por tratarse de una columna de fase inversa polimérica, en contraposición a las anteriores, de octadecil-



sílice. Se utilizó una columna PRP-1 (Hamilton) de 250 x 4,1 mm, tamaño de partícula 10  $\mu\text{m}$  y diámetro de poro 100 Å. Empleando el eluyente de composición metanol:agua 80:20 y un caudal de 0,8 ml/min, la presencia de OP no fue detectada ni aún en 60 minutos de corrida. Se redujo entonces la cantidad de agua en el eluyente en un factor 10, resultando en una nueva mezcla de concentraciones 98% metanol-2% agua. El analito eluyó como un pico simétrico, de ancho aproximado 2 min, aunque apenas resuelto del pico del solvente. Por eso, se pensó que una composición de fase móvil intermedia podría dar lugar a un pico de forma adecuada en un tiempo razonable, y se evaluó una mezcla de composición 87,5% metanol-12,5% agua. Como consecuencia de este cambio, se obtuvo para el OP una buena forma de pico y un tiempo de corrida de 16 minutos (ver Figura 18).

Se incorporó en esta instancia la detección de fluorescencia molecular. Por tratarse de una aplicación en muestras de concentraciones iniciales pequeñas sobre las cuales se deseaba ver el decaimiento a lo largo de varios días de ensayo, se requería de un método de alta sensibilidad. Ahel y Giger [Ahel y Giger, 1985-*b*] emplearon este tipo de detección bajo las condiciones de separación detalladas más arriba, con longitudes de onda de excitación y emisión de 225 y 295 nm, respectivamente. Otros autores trabajaron a longitudes de onda levemente diferentes (por ejemplo, 230 nm para la excitación y 302 nm para la emisión) obteniendo resultados similares [Rissler, 1996]. Se seleccionó por lo tanto como longitudes de onda de trabajo 230 y 300 nm (para excitación y emisión, respectivamente). Bajo estas condiciones, se obtuvo una relación señal/ruido que superó en 38 veces a la resultante de la detección UV a 230 nm.

Por otra parte, las muestras presentaban material en suspensión a causa de la actividad metabólica de los peces. Debido al carácter altamente lipofílico del analito, la filtración del agua a través de las membranas que usualmente se emplean previo a la inyección de muestras en HPLC (de Nylon o acetato de celulosa, de tamaño de poro 0,22 ó 0,45  $\mu\text{m}$ ) no fue posible, ya que un alto porcentaje del compuesto quedaba retenido sobre los filtros. Por ese motivo, se decidió procesar las muestras por extracción en fase sólida sobre C-18. Este pre-tratamiento daría lugar, adicionalmente, a la pre-concentración de las muestras, lo que favorecería la detección. Para realizar las extracciones se prepararon columnas de vidrio de 8 ml con fritas de teflón y 500 mg de fase sólida, las cuales fueron acondicionadas con 4 ml de metanol y equilibradas con 6 ml de agua *nanopure*. Luego del agregado de NaCl 5% m/v como agente de *salting-out*, las muestras fueron percoladas con un flujo de 3 ml/min, mediante aplicación de vacío. La elución de interferencias se realizó con 6 ml de agua *nanopure* y el adsorbente se secó mediante aplicación de vacío. El analito se eluyó con 4 ml de

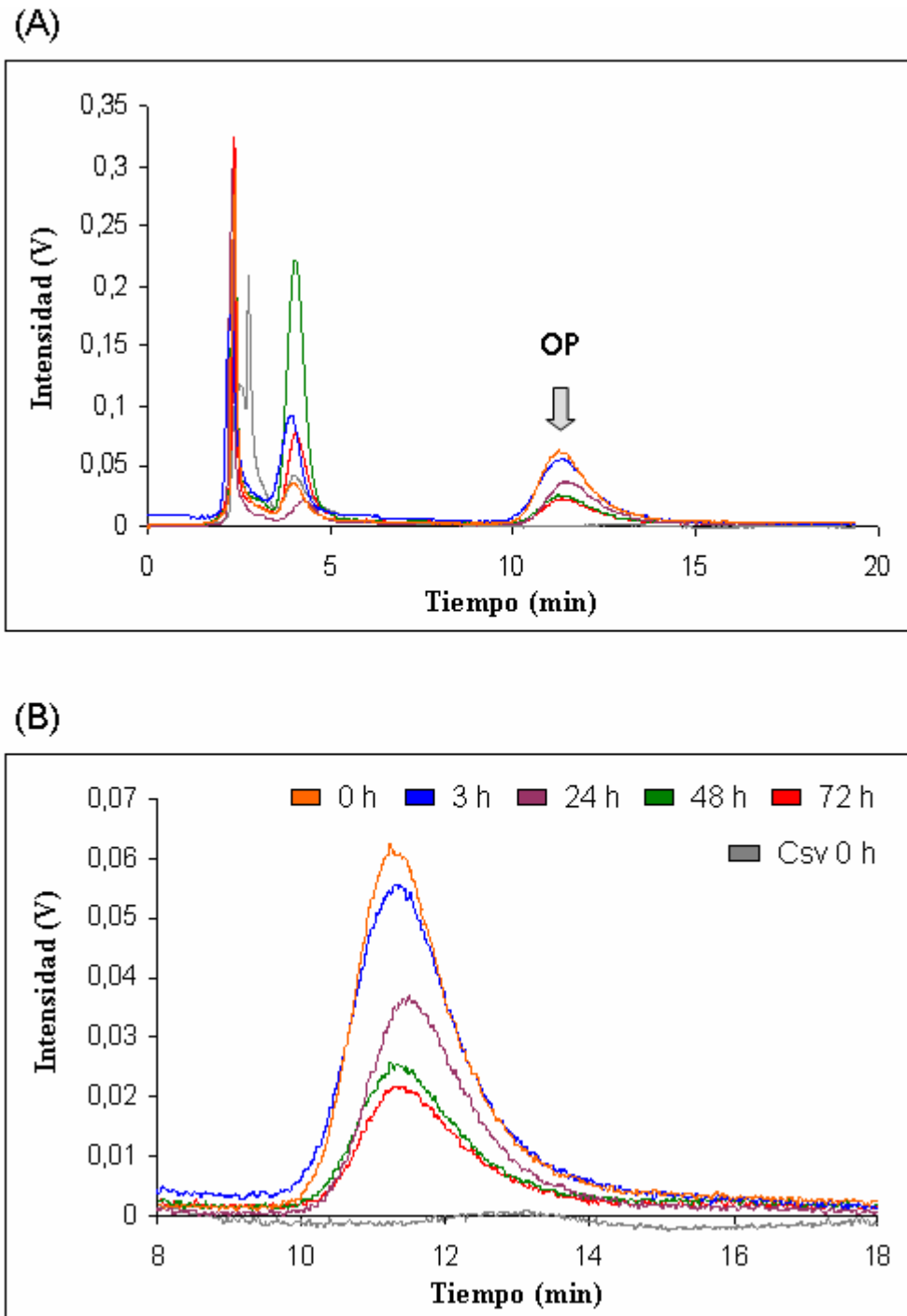
metanol (por gravedad) y los extractos metanólicos se inyectaron en el cromatógrafo. La eficiencia de la extracción fue evaluada comparando las áreas cromatográficas correspondientes a una muestra de OP 100 µg/l con y sin extracción en fase sólida previa (teniendo en cuenta un factor de concentración de 12,5) y resultó del 97%.

### **3.3.2. APLICACIÓN A LAS AGUAS DE ENSAYO**

El agua empleada en los ensayos consistía en agua corriente de red filtrada con un purificador doméstico PSA Senior (Pugliese SA). Como recipientes de ensayo se utilizaron acuarios de vidrio con un volumen de agua de 4 l, los cuales estaban provistos de aireación en forma permanente. Las soluciones madre de OP se prepararon en etanol 96° (p.a.). En todos los casos se tomaron 50 ml de muestra, los cuales fueron almacenados en frascos de vidrio color caramelo a 4°C luego del agregado de 0,5 ml de formaldehído 37% v/v, y procesados dentro de una semana. Se obtuvieron además muestras del tratamiento control con solvente (0,01% etanol) y sin solvente.

Las larvas de *Ciclasoma dimerus* fueron expuestas a concentraciones nominales de 1, 10 y 100 µg/l OP; la evaluación de la evolución temporal de las concentraciones reales de OP en el agua de estos ensayos se llevó a cabo tomando muestras a las 0, 3, 24, 48 y 72 h de los acuarios con concentraciones nominales de 10 y 100 µg/l. Por otra parte, los ejemplares adultos fueron expuestos a concentraciones nominales de 30, 150 y 300 µg/l OP y la caída de la concentración de OP en el agua de ensayo se midió sólo para el tratamiento con 150 µg/l OP.

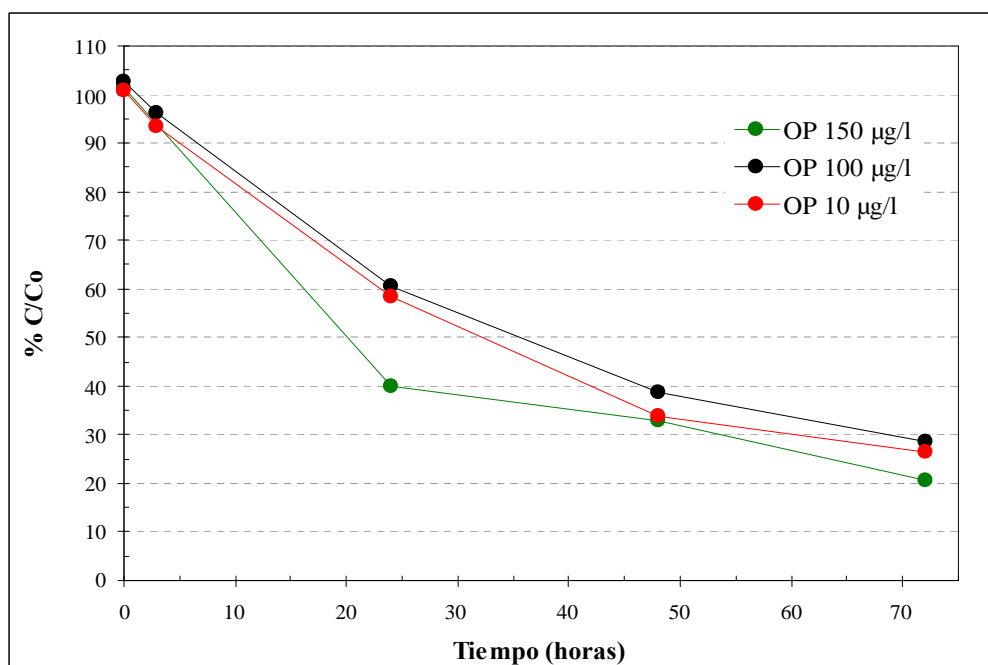
Las curvas de calibración (para área de pico) se construyeron a partir de soluciones patrón de OP preparadas adicionando cantidades conocidas de la solución madre en metanol al agua de los recipientes control y procesando estas soluciones del mismo modo que las muestras. Los valores de los coeficientes de correlación (R) de las curvas de calibración fueron siempre mayores que 0,988. En la Figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos en el seguimiento de la evolución temporal de la concentración de OP para el ensayo de concentración nominal 10 µg/l.



**Figura 18:** Cromatogramas correspondientes a la evolución temporal de la concentración de OP para el ensayo de concentración nominal 10  $\mu\text{g/l}$ . (A) cromatogramas completos; (B) detalle de los picos correspondientes a OP. Fase móvil: 87,5% MeOH-12,5% agua. Caudal: 0,80 ml/min. Longitudes de onda de detección: 230 nm (excitación) / 300 nm (emisión). Volumen de inyección: 200  $\mu\text{l}$ . Temperatura ambiente.

Los análisis de HPLC mostraron que las concentraciones de OP en los recipientes de ensayo decaían rápidamente tanto en las peceras con ejemplares adultos como con larvas, tal como puede

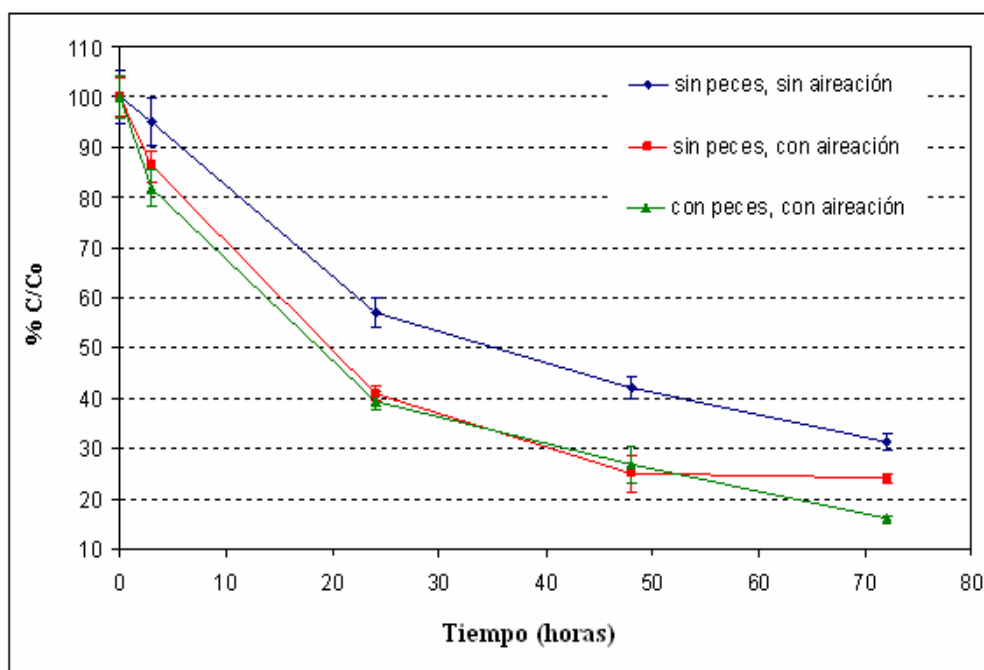
apreciarse en las Figuras 18 y 19. En ambos casos, la concentración real de OP mostró un descenso marcado en las primeras 24 horas; al cabo de 72 horas (tiempo cercano al que se realizaron los recambios de agua), la concentración medida fue siempre menor que el 30% de la inicial.



**Figura 19.** Evolución temporal de la concentración de OP en el agua del tratamiento con 10 y 100 µg/l (ensayos con larvas) y 150 µg/l del compuesto (ensayos con adultos). Se representa la relación porcentual entre la concentración medida y la concentración nominal del ensayo (%C/Co) en función del tiempo transcurrido desde el recambio del agua.

En otros estudios en los que se emplearon diseños de exposición semiestáticos se evidenció un comportamiento similar para compuestos alquifenólicos y estrógenos naturales y sintéticos. Por ejemplo, Metcalfe y colaboradores observaron que la concentración de 17β-estradiol disminuía hasta un 43% de la concentración nominal en un período de 48 h [Metcalfe *et al.*, 2001] y registraron un descenso de la concentración de NP hasta un 29% de la concentración nominal en el mismo período de tiempo [Balch y Metcalfe, 2006]. Por su parte, Kinberg y col. [Kinnberg *et al.*, 2000] evidenciaron que la concentración de NP caía a un 30-59% a las 24 h, 18-25% a las 48 h, 15-23% a las 72 h y 8-14% a las 96 h, según la concentración nominal evaluada. Entre las posibles causas de la desaparición del OP en el agua de ensayo se cuentan la degradación microbiana, la ruptura del anillo aromático y la oxidación, la fotólisis, la adsorción a la materia orgánica del vidrio y a los sólidos en suspensión, y la metabolización por parte de los peces [Ekelund *et al.*, 1993; Ahel *et al.*, 1994-c; Lewis y Leech, 1996; Ying *et al.*, 2002].

En este contexto, y a fin de evaluar la contribución de dos de los factores mencionados sobre el descenso progresivo de la concentración de OP en el agua de ensayo durante el período de 72 h, se realizó un experimento en el que tres acuarios con ejemplares en estadio larval y con una concentración nominal de 100 µg/l fueron acondicionados de tres maneras distintas: a) sin peces y sin aireación, b) sin peces y con aireación, y c) con peces y con aireación; se tomaron dos muestras de agua de cada acuario. En la Figura 20 se muestran los resultados.



**Figura 20:** Descenso de la concentración de OP de concentración nominal 100 µg/l de durante un período de 72 h bajo tres condiciones distintas

Pudo observarse que, en el presente estudio, la aireación del agua de ensayo fue un factor importante en la caída de la concentración del compuesto; la presencia de larvas pareció contribuir en proporción mucho menor al descenso de la concentración de OP.

### 3.3.3. EFECTOS REGISTRADOS ANTE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A OP

En el caso de los estadios larvales y juveniles de *Ciclasoma dimerus*, la exposición a ambas concentraciones de OP tuvo un efecto estrogénico sobre el proceso de diferenciación sexual,

evidenciado en la aparición de un 35% de machos intersexo. Esta condición se caracteriza por la presencia de oocitos (células germinales femeninas) en el interior del testículo. Los efectos registrados resultaron en cierta forma dependientes de la concentración del compuesto en el agua. La dosis-dependencia se evidenció no en el porcentaje de individuos intersexo correspondiente a cada concentración sino en la cantidad de oocitos presentes en las gónadas de los machos intersexo. Mientras que en los intersexos provenientes de los tratamientos con 1 y 10 µg/l OP se registró la presencia de a lo sumo un oocito por sección histológica, en los intersexos tratados con 100 µg/l OP se observaron hasta nueve oocitos por corte.

En el caso de los individuos adultos, la exposición a las tres concentraciones del xenoestrógeno indujo la aparición de vitelogenina tanto en el plasma como en el mucus superficial de los machos. Asimismo, el análisis histológico reveló la presencia de alteraciones en los tejidos gonadales de los machos tratados con 150 y 300 µg/l OP, así como una alteración de la espermatogénesis en los machos expuestos a la mayor concentración del compuesto.

La evaluación de la velocidad de desaparición del compuesto en el agua de ensayo es importante a la hora de analizar cuáles fueron las concentraciones reales que produjeron los efectos encontrados. En ese sentido, la frecuencia de recambio del medio condujo a una exposición a OP de tipo pulsátil. Los resultados indican que para lograr una exposición constante a una concentración estable de estas sustancias se requiere de un sistema de flujo continuo, ya que los diseños semiestáticos como el empleado en este estudio no garantizan la exposición permanente a las concentraciones nominales de ensayo, aún cuando se recambie el medio diariamente. Las determinaciones analíticas indican que los efectos estrogénicos registrados en la especie *Ciclasoma dimerus* como consecuencia de la exposición crónica a OP se manifestarían a concentraciones reales considerablemente menores que las concentraciones nominales ensayadas, que por otro lado son comparables a las concentraciones de alquilfenoles (OP y NP) registradas ocasionalmente en muestras de agua superficial de ambientes acuáticos naturales. Si bien es cierto que la biodisponibilidad de estos compuestos en el ambiente es diferente a la que se da en un ensayo de laboratorio, la realización de bioensayos es una aproximación útil para evaluar el posible impacto de los estrógenos ambientales en las poblaciones de peces silvestres. De hecho, muchos de los efectos comprobados en ensayos de laboratorio han sido registrados también en ejemplares capturados en ambientes acuáticos que reciben la descarga de este tipo de contaminantes.

## 4. CONCLUSIONES

Esta etapa del trabajo de tesis se abocó, fundamentalmente, al estudio de la separación de los metabolitos lipofílicos NP1EO, NP2EO y NP por HPLC en fase normal sobre aminopropil-sílice y elución isocrática con mezclas binarias *n*-hexano/2-propanol, empleando detección UV a 277 nm. Se investigó en principio la determinación de los analitos a temperatura ambiente, y se incorporó en una segunda instancia la temperatura de la columna como variable experimental.

Los cromatogramas de nonilfenol grado técnico, el cual está constituido mayoritariamente por 4-nonilfenol, mostraron una contribución importante de sustancias de identidad desconocida eluyendo con tiempos de retención similares a los de 4-NP1EO. Esos compuestos, identificados como isómeros de 2-NP a través del análisis por GC-MS, fueron tenidos en cuenta al optimizar la separación. Por otra parte, el 4-NP eluyó como un pico claramente desdoblado, hecho que pudo ser atribuido a una separación parcial de los isómeros ramificados de la cadena alquílica.

Se encontró que la elución isocrática con la mezcla *hexanos*/2-propanol a temperatura ambiente presentaba ciertas limitaciones. Existían dos *pares críticos* de compuestos, cuyas resoluciones tenían un comportamiento opuesto frente a la proporción de 2-propanol en el eluyente. Todas las demás separaciones ocurrían casi completamente aún cuando uno o ambos de estos pares de compuestos (2-NP/4-NP1EO y 4-NP2EO/4-NP) se encontraban completamente solapados. Se decidió entonces incorporar una variable usualmente poco explorada en las separaciones cromatográficas: la temperatura de la columna.

La selección de un método para el análisis cuantitativo se llevó a cabo empleando una columna que fue recuperada luego de haber sufrido envejecimiento por circulación prolongada de concentraciones altas de 2-PrOH. La recirculación de *hexanos* a 50 °C permitió una eliminación importante del efecto residual encontrado y llevó el comportamiento cromatográfico hacia un estado estacionario que, aunque difería levemente del inicial, se mantuvo inalterable a lo largo de las numerosas corridas subsiguientes. El método seleccionado involucró una composición de fase móvil de 4,1% 2-propanol en *hexanos*, un caudal de 0,65 ml/min y una temperatura de columna de 35 °C, y permitió la resolución de todos los compuestos de interés en 17 minutos de corrida. Las curvas de calibración, construidas para áreas de pico en el intervalo de concentraciones de 0,025 a 5,0 µg/ml (empleando detección UV a 277 nm) presentaron en todos los casos respuestas lineales, con R mayor que 0,9996. Para 10 inyecciones sucesivas de una mezcla de concentración 0,35

$\mu\text{g/ml}$ , se obtuvieron desviaciones estándar relativas menores que 3,5% para las áreas de pico y que 0,4% para los tiempos de retención. Los límites de detección resultaron 4, 8, 10 y 6  $\mu\text{g/l}$  para TMP, 4-NP1EO, 4-NP2EO y *t*-NP, respectivamente. El método cromatográfico desarrollado demostró ser sensible, preciso y robusto y, acoplado a detección de fluorescencia molecular, fue implementado exitosamente en la instancia posterior del análisis de muestras ambientales.

Por otra parte, se investigaron de un modo profundo los cambios en la retención de los analitos y en la selectividad de la separación surgidos a partir de variaciones conjuntas del caudal de fase móvil, la composición del eluyente y la temperatura de la columna. Empleando una columna de aminopropil-sílice nueva, a la cual se cuidó de no someter a condiciones de envejecimiento, se llevó a cabo la búsqueda de una ecuación que describiera el comportamiento de retención de los analitos. Así, se propuso y se validó el siguiente modelo para los factores de retención:  $\ln k = A + B \ln (\% \text{ 2-PrOH}) + C (1/T)$ . Se demostró que, al menos dentro de los límites experimentales explorados, la introducción de la temperatura del horno en la ecuación tenía un sentido termodinámico, ya que la adición de un término de interacción *caudal-temperatura del calefactor* no presentó significado estadístico. El diseño de experimentos seleccionado, de tipo *Doehlert*, permitió obtener una buena precisión en el cálculo de los coeficientes. La dependencia lineal de  $\ln k$  con  $\ln (\% \text{ 2-PrOH})$  y  $1/T$  fue clara, con una pequeña dispersión en los datos. Los *errores de predicción cuadráticos medios* arrojaron valores entre 2 y 5% para  $\ln k$  y entre 0,7 y 2% para  $k$  de los diferentes analitos, confirmando de este modo la bondad del modelo.

Se hizo evidente una marcada reducción de la retención de todos los compuestos para proporciones crecientes de 2-PrOH en el eluyente, a la vez que todos ellos exhibieron un comportamiento exotérmico. Los cambios producidos en la selectividad se resumen a continuación. En primer lugar, para el par de compuestos TMP/2-NP (I) la selectividad disminuyó a medida que se aumentó la fuerza del eluyente y resultó prácticamente independiente de la temperatura de la columna, pero fue siempre lo suficientemente alta como para mantener la resolución completa de los analitos, hecho que confirió al TMP características apropiadas para ser utilizado como estándar interno. Los demás grupos de compuestos, en cambio, se vieron seriamente afectados. En el caso de 2-NP (II)/4-NP1EO, el par sufrió una inversión en el orden de elución; cuando 2-NP (II) eluyó más tarde que 4-NP1EO, la resolución de isómeros del grupo I de 2-NP fue mayor y, entonces, fue ese grupo de isómeros el que se solapó parcialmente con el 4-NP1EO y la separación en su conjunto se deterioró. Para el par 4-NP1EO/4-NP2EO, los cambios en la selectividad a partir de variaciones en la composición de la fase móvil resultaron mínimos; en cambio, dicha variable se vio mucho más



afectada a medida que se modificó la temperatura de la columna, aumentando su valor para temperaturas decrecientes. El par 4-NP2EO/4-NP mostró ser el más sensible ante variaciones en las condiciones experimentales, y su separación se puso en peligro a temperaturas bajas y concentraciones de 2-PrOH elevadas.

La selección de la mejor zona de trabajo se realizó a través del cálculo de la *función de deseabilidad*. Así, pudo visualizarse la existencia de una región restringida del espacio experimental, la cual involucró temperaturas sustancialmente mayores que la ambiente (entre 34 y 55 °C), donde la separación de estándar interno, analitos y compuestos asociados resultaba aceptable. Las concentraciones de 2-PrOH abarcadas en esa región fueron de 5,0% o superiores. En ese sentido, pudieron notarse ciertas diferencias con las condiciones de separación seleccionadas con la primera columna *amino* ensayada. Esas diferencias podrían atribuirse, en primer lugar, a diferencias en la manufactura, por tratarse de dos fabricantes diferentes y, en segundo lugar, a los efectos residuales de la circulación de concentraciones elevadas del alcohol en dicha columna.

En líneas generales, puede decirse que la incidencia que la temperatura de la columna puede tener sobre la retención de los analitos y la selectividad de las separaciones demostró ser significativa para las especies y las condiciones instrumentales empleadas. Haciendo extensivo -a priori- este comportamiento para otras especies y condiciones de separación, es importante tener en cuenta que, aún en aquellas circunstancias en que se obtuvieran resultados satisfactorios a temperatura ambiente, la variabilidad en la temperatura del laboratorio podría dar origen a resultados cromatográficos erráticos si el compartimiento de la columna no se encontrara termostatzado.

Adicionalmente, se llevó a cabo el desarrollo un método para la separación de los oligómeros superiores componentes del NP10EO, aplicando elución con un gradiente binario de *hexanos*/2-PrOH. El programa de gradiente implementado permitió obtener una línea de base con una deriva aceptable, así como una buena discriminación de oligómeros con un número de hasta 17 grupos etoxilo, en 40 minutos de corrida.

El método fue aplicado en un estudio destinado a evaluar si el NP10EO es potencialmente biodegradable bajo condiciones desnitrificantes, y la cromatografía líquida constituyó la base para el análisis de los perfiles de degradación del tensioactivo. Pudo observarse cómo la degradación del NP10EO evolucionó, a lo largo de 35 días de incubación en condiciones anóxicas y en presencia de nitrato, hacia la formación de NP como producto principal. La concentración de nitrato disminuyó en paralelo con la degradación del NP10EO, mientras que la de nitrito creció a partir del día 7 hasta

un máximo en el día 21, en forma concurrente con la formación de NP. Bajo las condiciones empleadas en estos experimentos, la degradación del NP10EO en ausencia de oxígeno molecular fue estrictamente dependiente de la presencia de nitrato. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la degradación anóxica de los NP $n$ EO puede proceder hacia la formación de NP en condiciones desnitrificantes y en presencia de la comunidad microbiana autóctona empleada. Dado que, según indican varios estudios, el NP sería susceptible de degradación por bacterias aeróbicas especializadas, estos resultados presentan un antecedente importante para el desarrollo de estrategias secuenciales de tratamiento biológico anóxico-aeróbico de efluentes que contienen polietoxilatos de alquilfenol.

En otro orden de cosas, se participó en un estudio sobre los efectos estrogénicos del 4-*ter*-octilfenol en el pez dulceacuícola autóctono *Cichlasoma dimerus*, a través del desarrollo y la aplicación de un método destinado a determinar las concentraciones reales del xenobiótico en las aguas de ensayo, a lo largo de los experimentos.

Empleando una columna de fase inversa polimérica, una mezcla de composición 87,5% metanol-12,5% agua como eluyente y un caudal de 0,8 ml/min, se obtuvo para el OP una buena resolución en un tiempo de análisis razonable y, empleando detección de fluorescencia a longitudes de onda de 230 (excitación) y 300 nm (emisión), se obtuvo una relación señal/ruido que superó en 38 veces a la resultante de la detección UV a 230 nm. Las muestras fueron procesadas por extracción en fase sólida sobre C-18 y eluidas con metanol, dando lugar a una recuperación del 97%. Las curvas de calibración, construidas para soluciones patrón de OP preparadas adicionando cantidades conocidas de la solución madre al agua de los recipientes control y procesando esas soluciones del mismo modo que las muestras, arrojaron coeficientes de correlación mayores que 0,988.

Los análisis de HPLC mostraron que las concentraciones de OP en los recipientes de ensayo decaían rápidamente tanto en las peceras con ejemplares adultos como con larvas. En ambos casos, la concentración real de OP mostró un descenso marcado en las primeras 24 horas y, al cabo de 72 horas, la concentración medida fue siempre menor que el 30% de la inicial. Pudo demostrarse que, en el presente estudio, la aireación del agua de ensayo fue un factor importante en la caída de la concentración del compuesto, mientras que la presencia de larvas contribuyó en proporción mucho menor.

En el caso de los estadios larvales y juveniles de *Cichlasoma dimerus*, la exposición a ambas concentraciones de OP tuvo un efecto estrogénico sobre el proceso de diferenciación sexual,

evidenciado en la aparición de un 35% de machos intersexo. En el caso de los individuos adultos, la exposición a las tres concentraciones del xenoestrógeno indujo la aparición de vitelogenina tanto en el plasma como en el mucus superficial de los machos, además de alteraciones en los tejidos gonadales y en la espermatogénesis en los machos expuestos a la mayor concentración del compuesto. Debido a que pudo determinarse que la frecuencia de recambio del medio condujo a una exposición de OP de tipo pulsátil, puede concluirse que los efectos estrogénicos registrados como consecuencia de la exposición crónica a OP se manifestarían en realidad a concentraciones considerablemente menores que las concentraciones nominales ensayadas.

## **CAPÍTULO 4**

### ***Análisis de Muestras Ambientales***

# 1. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia directa del modo en que son utilizados, una gran parte de los AP $n$ EO es dispuesta a través de efluentes líquidos. Así, se someten a procesos de degradación biológica en las plantas de tratamiento de aguas de desecho, o en el ambiente acuático cuando son descargados directamente en cursos de agua naturales. Tal como ha sido adelantado en los capítulos precedentes, la bio-transformación ocurre, pero finalmente se introduce en el ambiente acuático una mezcla compleja de metabolitos persistentes, más tóxicos que los compuestos de partida, bio-acumulables y con actividad estrogénica [Ahel *et al.*, 1994-*b*; Snyder *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001; Berryman *et al.*, 2004; Vitali *et al.*, 2004; Vethaak *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2007].

Estos compuestos bio-refractarios, fuertemente lipofílicos, tienen una tendencia elevada a adsorberse sobre sedimentos y barros [Thiele *et al.*, 1997]. Por ello, su presencia en la fase líquida puede tomarse como un marcador importante de acumulación y contaminación [Vitali *et al.*, 2004]. Por ser los NP $n$ EO el sub-grupo más ampliamente utilizado entre los AP $n$ EO, los etoxímeros mono- y dietoxilados (NP1EO y NP2EO), y el nonilfenol, han sido detectados frecuentemente en cuerpos de agua (incluyendo aguas de desecho, superficiales, subterráneas e incluso costeras) de diversas regiones de Europa, Asia y América del Norte durante las últimas décadas [Thiele *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001; Ying *et al.*, 2002; Berryman *et al.*, 2004; Vethaak *et al.*, 2005]. Debido a esos hallazgos, las regulaciones europeas han seguido la recomendación de eliminar progresivamente el uso de AP $n$ EO en productos de limpieza hogareños e industriales a partir del año 2003, aunque en países como Suiza y Alemania varias asociaciones industriales habían acordado en forma voluntaria, ya en el año 1986, disminuir el uso de estos detergentes en formulaciones domésticas [Günther *et al.*, 2001].

En los países de América Latina, en cambio, el uso de los AP $n$ EO no tiene ningún tipo de restricción especial. Y lo que es aún más importante, los estudios sobre la incidencia de esta clase de tensioactivos en el ambiente acuático son realmente muy escasos, tal como se los detallará a continuación. En el año 2001, en un estudio cualitativo preliminar sobre una muestra del río Matanza (en el conurbano bonaerense), nuestro grupo detectó –por primera vez en la Argentina– la presencia de NP, NP1EO y NP2EO [Babay *et al.*, 2001]. Más tarde, y como parte de un estudio destinado a evaluar la situación ecotoxicológica del río Luján (situado al NE de la provincia de Buenos Aires) otros investigadores detectaron la presencia de nonilfenol entre diversos compuestos bio-acumulables, mediante análisis cualitativo por micro-extracción en fase sólida/GC-MS [Di

Marzio *et al.*, 2005]. En un trabajo más reciente, fueron determinadas las concentraciones de alquilfenoles provenientes de la aplicación de pesticidas en los sedimentos y aguas superficiales de cuatro reservorios en la Mata Atlántica al sudoeste de San Pablo (Brasil) [Fiedler *et al.*, 2007] y, en otro, se evaluó un método para la determinación simultánea de productos farmacéuticos ácidos y disruptores endocrinos seleccionados –entre ellos el 4-NP– por medio del análisis de dos muestras de agua de desecho y dos de manantial del norte de la ciudad de México [Gibson *et al.*, 2007].

La parte final del presente trabajo de tesis fue, por consiguiente, diseñada para lograr dos objetivos principales. El primero de ellos fue el de contribuir con una metodología analítica simple y accesible para la medición cuantitativa de 4-NP1EO, 4-NP2EO y 4-NP en muestras acuosas ambientales. El análisis de muestras ambientales presentaba algunos problemas particulares, dados fundamentalmente por los niveles de concentración muy bajos (pero ecológicamente relevantes) esperables para este tipo de compuestos (en el orden de los micro- o incluso nanogramos por litro), sumados a la potencial presencia de sustancias interferentes, muchas veces de origen e identidad desconocidos.

Una revisión de las publicaciones más recientes acerca de la determinación de los AP $n$ EO y sus productos de degradación biológica en este tipo de muestras, permite ver que la mayor parte de los trabajos documentados hacen referencia al uso de la HPLC en fase inversa sobre columnas de C-18 acoplada a la detección por espectrometría de masas (LC-MS), luego del pre-tratamiento de la muestra por extracción en fase sólida sobre un soporte hidrofóbico (usualmente también C-18) [Ferguson *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2000; la Farré *et al.*, 2001; Loos *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Berryman *et al.*, 2004; Swartz *et al.*, 2004; Lara-Martín *et al.*, 2006; Pojana *et al.*, 2007]. Mediante el acoplamiento directo de la salida del cromatógrafo líquido a un espectrómetro de masas se compensa, en gran medida, la resolución incompleta de las diferentes moléculas de interés sobre la fase inversa, ofreciendo un aumento de la selectividad en relación a los métodos que utilizan detección por absorción molecular. Sin embargo, la instrumentación que esta técnica moderna, altamente selectiva y sensible requiere, es todavía financieramente inaccesible para la mayoría de los laboratorios que realizan análisis de muestras ambientales, tanto en la Argentina como en el resto de América Latina. Por ello, en este trabajo se propuso, sobre la base del acoplamiento de técnicas de enriquecimiento y de separación bien establecidas, una metodología alternativa, económicamente mucho más viable.

La metodología propuesta consistió en un paso de extracción y pre-concentración sobre fase sólida de C-18, seguido por la separación y cuantificación por cromatografía líquida en fase normal sobre columnas de amino-sílice con detección de fluorescencia molecular (la detección de fluorescencia

es reconocida por sus grados de selectividad y sensibilidad superiores a los ofrecidos por la de absorción UV). Tanto durante el desarrollo del método, como ante la eventual necesidad durante el análisis rutinario de muestras reales, la confirmación de la identidad de los picos podría ser implementada de un modo directo a través del acoplamiento *off-line* con instrumentos de GC-MS (mucho más ampliamente distribuidos que los de LC-MS). Esto se llevaría a cabo mediante la colección de las fracciones correspondientes a los picos de HPLC de los tres analitos por separado, y su re-inyección independiente en el cromatógrafo gaseoso, luego de la evaporación de los solventes orgánicos volátiles utilizados para la elución de HPLC y la redisolución apropiada de la muestra [Snyder *et al.*, 1999; Günther *et al.*, 2001].

La aproximación instrumental propuesta para la cuantificación (HPLC sobre columnas amino/detección de fluorescencia) sigue básicamente la de Ahel y colaboradores para la determinación de los metabolitos estrogénicos de NP $n$ EO en aguas superficiales y de desecho [Ahel *et al.*, 2000-*a*; Ahel *et al.*, 2000-*b*]. En lo que respecta al enriquecimiento de los analitos a partir de las muestras acuosas, sin embargo, el tedioso procedimiento de extracción líquido-líquido utilizado por los mencionados autores es, en el presente trabajo, reemplazado por la extracción en fase sólida sobre soportes de C-18. Cuando el análisis por HPLC con una columna de fase normal (la cual interactúa a través de la región polar de las moléculas) sigue al enriquecimiento sobre un material hidrofóbico (cuya interacción con las moléculas de la muestra se da justamente a través del extremo opuesto) es de esperar que el grado de selectividad que finalmente se alcance sea alto.

El segundo de los objetivos planteados fue el de poder evaluar el método propuesto en el estudio del caso real de una planta de tratamiento de aguas de desecho, sus efluentes y el curso de agua receptor. Los datos cuantitativos esperados constituirían, además, uno de los primeros reportes de su clase para un país de América Latina.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. INSTRUMENTAL**

Bomba binaria *SpectraSERIES P200* (Thermo Separation Products, Estados Unidos)

Válvula de inyección Rehodyne 7125 (Estados Unidos)

Calefactor para columnas de HPLC Eppendorf CH-30, con un sistema de control de temperatura Eppendorf TC-50 (Alltech, Estados Unidos)

Detector de fluorescencia molecular Linear LC-305 (Linear Instruments, Estados Unidos). Los datos fueron para adquiridos y procesados con el software *Konikrom 5.2* (Konik Instruments, España)

Cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-17A con sistema de inyección *split-splitless*, acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar MS-QP5050A (Shimadzu Corporation, Japón). Incluye la librería espectral WILEY 229

Cromatógrafo gaseoso HP 5890-A con sistema de inyección *split-splitless* y detección de ionización de llama (Hewlett-Packard, Estados Unidos)

## 2.2. MATERIALES Y REACTIVOS

Nonilfenol grado técnico (Fluka, Suiza)

4-NP1EO (Promochem, Alemania)

4-NP2EO (Promochem, Alemania)

NP<sub>n</sub>EO con un promedio de 10 unidades de óxido de etileno (Proquimia S.A., Chile)

2,4,6-trimetilfenol (Fluka, Suiza)

*Hexanos* (*n*-hexano 95%) y ciclohexano grado HPLC (Sintorgan, Argentina)

2-Propanol, metanol y acetato de etilo grado HPLC (Sintorgan, Argentina o Merck, Alemania).

Agua *nanopure*, resistividad 18 MΩ cm, obtenida con una unidad de purificación de agua Simplicity (Millipore, SP, Brasil)

NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) p.a. (Merck, Alemania)

HCl (36.5%) p.a. (Mallinckrodt-Baker, México)

Pre-filtros de fibra de vidrio APFD 04700 (Millipore, Irlanda)



Para la extracción en fase sólida, columnas de vidrio de 8 ml y fritas de PTFE (Merck, Alemania), rellenas en el laboratorio con octadecil-sílice LiChrolut RP-18 (Merck, Alemania) o CEC-18 (UCT, Estados Unidos)

Solución acuosa de formaldehído 37%, p.a. (Fluka, Suiza)

## **2.3. PROCEDIMIENTOS**

### **2.3.1. GENERALES**

Las soluciones estándar de los analitos se prepararon por dilución y mezcla de soluciones madre de aproximadamente 1000 mg/l de *t*-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO en ciclohexano, *hexanos* o metanol. Una solución madre de aproximadamente 10000 mg/l de NP10EO fue preparada en 2-propanol. Todas las soluciones fueron conservadas a 4 °C.

Tanto el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro como el NaCl (ambos calidad *para análisis* de Merck) fueron calentados en estufa a 650 °C por 12 horas antes de su uso. En el caso del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el cual sería utilizado para remover trazas de agua remanentes en los extractos orgánicos previo a su evaporación, el secado en estufa se realizó para activarlo (es decir, para eliminar el agua adsorbida durante el almacenamiento); posteriormente, fue conservado en desecador hasta el momento de su uso. En el caso del NaCl (que sería empleado como agente de *salting-out* para aumentar la eficiencia de las extracciones) el calentamiento a alta temperatura se llevó a cabo para eliminar trazas de impurezas orgánicas; este paso fue incorporado ya que las primeras pruebas indicaron que luego del proceso de extracción/pre-concentración y para un factor de enriquecimiento de 1000, la sal contribuía con cantidades detectables de sustancias que eluían en la misma zona que los analitos. Ante estos resultados, se decidió también someter los filtros de fibra de vidrio (que serían empleados en la filtración de las muestras antes de la SPE) a un calentamiento previo, para eliminar potenciales interferencias; en este caso, se calentó el material a 450 °C durante 5 horas.

Dado que se deseaba llevar a sequedad tanto los extractos de SPE como las fracciones eluidas de HPLC para su posterior re-disolución en cantidades precisas de los solventes apropiados, se ensayó inicialmente la recuperación de los analitos y el estándar interno (TMP) luego de la evaporación completa del solvente. Se evaporaron (con corriente de nitrógeno y a 50 °C) soluciones estándar de

los cuatro compuestos en ciclohexano y se re-disolvieron los residuos secos en *hexanos* para su inyección en HPLC. Como resultado, se observó que la recuperación de los tres analitos rondaba el 100%, mientras que la del TMP (el compuesto estudiado como potencial estándar interno a lo largo de los capítulos precedentes) fue sólo del 46%. El hecho observado podría atribuirse a la mayor volatilidad del 2,4,6-trimetilfenol con respecto a los analitos de interés. Un hecho similar había sido detectado por Snyder y col. [Snyder *et al.*, 1999] para la recuperación del butilfenol; cuando la temperatura de evaporación superaba los 30 °C o cuando no se controlaba cuidadosamente el volumen de solución remanente, los autores encontraban pérdidas de hasta 50% por evaporación, mientras que la recuperación de los analitos (estrógenos naturales y xenoestrógenos) superaba siempre el 80%. En los trabajos en los cuales se basó la elección de TMP como posible estándar interno [Ahel *et al.*, 2000-*a*; Ahel *et al.*, 2000-*b*], el solvente de extracción (*n*-hexano) se evaporaba hasta un volumen final de 0,5 ml. Sin embargo, en nuestro caso era necesario cambiar el solvente de extracción de SPE para poder inyectar las muestras en la columna amino y, en segundo lugar, no se contaba con tubos de vidrio graduados con una precisión tal que pudieran medirse de manera confiable volúmenes menores que 1 ml. Por esos motivos, la evaporación del solvente debía proceder hasta sequedad. Se tomó entonces la decisión de realizar el análisis de las muestras sin utilizar estándar interno, ya que para que una sustancia sea adecuada para tal fin, su comportamiento debe ser desde todo punto de vista similar al de los analitos.

Finalmente, vale la pena destacar que en aquéllos procedimientos donde se hizo imprescindible utilizar tuberías de plástico (por ejemplo, transporte de nitrógeno para la evaporación, succión de las muestras líquidas para su percolación en SPE, etc.) se emplearon siempre polímeros fluorocarbonados (de la familia del teflón). Ha sido comprobado que plásticos como el PVC y el poliestireno liberan alquifenoles, los cuales son utilizados como aditivos en la formulación de dichos materiales. De hecho, fue por contaminación del medio de cultivo a partir de los tubos de poliestireno utilizados en un ensayo de proliferación celular que se descubrió la potencia estrogénica del *para*-nonilfenol [Soto *et al.*, 1991].

A continuación se describen los procedimientos más específicos, la mayoría de los cuales encontrará correlación directa en la sección **Resultados y Discusión** del presente capítulo.

### 2.3.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE BLANCOS Y MUESTRAS MODELO

Para realizar una evaluación preliminar del método de enriquecimiento, se empleó agua *nanopure* adicionada con los analitos. Una evaluación más rigurosa de los porcentajes de recuperación y de la precisión del método se llevó a cabo posteriormente, con las muestras reales. Las mezclas de analitos para la adición estándar se prepararon en metanol, a partir de soluciones madre en ese solvente. El volumen de muestra ensayado fue de 500 ml, a un nivel de concentración de 2,5 µg/l de cada compuesto. También se incluyeron blancos, con el fin de chequear la ausencia (o eventual presencia) de sustancias interferentes surgidas en alguno de los pasos del manipuleo y tratamiento de las muestras.

Al comienzo del procedimiento se agregó al agua formaldehído, en concentración final de 1% (v/v). Esta sustancia, agregada a las muestras ambientales en el momento del muestreo, actuaría como preservante evitando la ulterior bio-degradación de los analitos por acción de los microorganismos presentes en el agua [Thiele *et al.*, 1997]. A continuación, las muestras fueron filtradas a través de filtros de fibra de vidrio; luego los filtros fueron enjuagados con una porción de MeOH ya que, cuando se trabaja con muestras naturales, es importante eluir la fracción de analitos adsorbida superficialmente sobre el residuo de filtrado para lograr una recuperación completa [Marcomini *et al.*, 1987]. La fracción metanólica fue colectada junto con el agua filtrada, resultando en una concentración final de 5% del solvente orgánico polar, tal como se recomienda cuando se extrae cantidades grandes (> 100 ml) de muestras acuosas por SPE sobre materiales hidrofóbicos, con el objeto de mantener activa la superficie del sorbente [Simpson (Ed.), 2000; International Sorbent Technology, 2004]. Una vez finalizada la filtración, se agregó a la muestra NaCl 5% (m/v) como agente de *salting-out*.

Las columnas de vidrio se llenaron con un 1 g de fase sólida de C-18, la cual fue acondicionada con 15 ml de MeOH como solvente de activación y equilibrada con 15 ml de agua *nanopure* antes del procesamiento de las muestras. Las muestras fueron entonces percoladas a través de las columnas por aplicación de vacío, a caudales de 8-10 ml/min. A continuación, el sorbente fue lavado con 15 ml de una mezcla agua:MeOH (90:10) y secado por aplicación de vacío (más adelante se discutirán los detalles sobre la duración de la etapa de secado). Una cantidad total de 15 ml de solvente de elución fue entonces pasada por la columna en alícuotas de 5 ml, a presión atmosférica. Para remover las trazas de agua remanentes en la fase orgánica, se adicionó una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro. Los extractos fueron evaporados a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno (a 50 °C), y el residuo fue redissuelto en una cantidad más pequeña de *hexanos*

(típicamente 0,5-1,5 ml, medidos con precisión), para la inyección en HPLC. Los porcentajes de recuperación fueron calculados a partir de inyecciones repetidas de una mezcla estándar de 0,8 mg/l de los analitos en ciclohexano.

### **2.3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA**

Las separaciones se realizaron sobre la columna de amino-sílice Pinnacle II (tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$  y dimensiones 250 x 4,6 mm, Restek) utilizada en los experimentos del Capítulo 3 de esta tesis. En el extremo de entrada se incorporó una pre-columna de la misma clase (10 x 4,0 mm, Pinnacle II, Restek), a fin de prolongar la vida útil de la columna, evitando que los compuestos carbonílicos y carboxílicos potencialmente presentes en las muestras naturales pudieran reaccionar irreversiblemente con la fase estacionaria amino de la columna.

Tal como fuera oportunamente adelantado, el método cromatográfico seleccionado para la determinación de los metabolitos lipofílicos consistió de elución isocrática con una solución 4,1% 2-PrOH en *hexanos* (preparada a diario) a un caudal de 0,65 ml/min, manteniendo la columna a una temperatura de 35 °C. Por otra parte, la medición simultánea de los etoxímeros cortos ( $0 \leq n \leq 2$ ) y largos ( $n \geq 3$ ) en muestras seleccionadas se llevó a cabo mediante elución con gradiente binario (solvente A: *hexanos*, solvente B: 2-propanol), introduciendo algunas modificaciones respecto del método desarrollado en el Capítulo 3. El programa se inició isocráticamente con 96% A - 4% B a un caudal de 0,65 ml/min por 19 min, seguido por un aumento lineal del caudal hasta 1 ml/min en 2 minutos; luego se aplicó un gradiente lineal de concentración hasta 50% A - 50% B en 29 minutos, y finalmente se sostuvieron 6 minutos en condiciones isocráticas con 100% B. La temperatura de la columna también se mantuvo a 35 °C. La identificación de los compuestos con menos de 3 grupos etoxilo se realizó con el agregado estándar de *t*-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, mientras que los etoxímeros superiores fueron asignados a partir de su secuencia de elución.

Los volúmenes inyectados fueron siempre de 50  $\mu\text{l}$ , a menos que se indique lo contrario.

En cuanto a la detección de fluorescencia, se registraron los espectros de excitación y emisión de los tres metabolitos a través del barrido espectral de los picos de HPLC, en tiempo real durante corridas isocráticas especialmente destinadas a tal fin. Se adquirieron las señales entre 200 y 300

nm para la obtención de los espectros de excitación, y entre 250 y 400 nm para la obtención de los espectros de emisión. Se identificaron los máximos para cada compuesto, permitiendo la selección de las condiciones de trabajo de máxima sensibilidad.

La colección de fracciones de HPLC para análisis por GC-MS se realizó a través de una válvula manual de 3 vías (Rheodyne 7030RV). En el momento de la colección, se realizó una primera inyección para determinar con precisión las ventanas de elución de 4-NP1EO, 4-NP2EO y 4-NP. A continuación, se inyectaron repetidamente 100 µl de los extractos (entre 2 y 5 veces), y las fracciones correspondientes a cada analito individual se colectaron juntas en un tubo de vidrio, a fin de constituir una masa de sustancia suficiente para la posterior determinación por GC-MS.

#### **2.3.4. CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Las tres fracciones colectadas de cromatografía líquida fueron inyectadas, por separado, en el instrumento de GC-MS luego de la evaporación completa de los solventes de HPLC bajo una corriente de N<sub>2</sub> y la re-disolución de los residuos secos en un volumen apropiado (25-100 µl) de ciclohexano.

Mediante el uso de columnas capilares, la cromatografía en fase gaseosa conduce a la obtención de complejos patrones de picos a partir de la inyección de nonilfenol y de sus homólogos etoxilados, debido a la separación de varios isómeros de la cadena alquílica C<sub>9</sub>H<sub>19</sub> [Giger *et al.*, 1981; Wheeler *et al.* 1997; Fries y Püttmann, 2003]. Los etoxilatos con longitudes de cadena corta (y los alquilfenoles) son plausibles de ser determinados directamente; limitado por el descenso de la volatilidad al aumentar el grado de etoxilación, el análisis por GC de los etoxímeros superiores requeriría indefectiblemente reacciones de derivatización previa [Thiele *et al.*, 1997].

La determinación de NP, NP1EO y NP2EO se encaró fundamentalmente sobre la base de los trabajos llevados a cabo por Giger y col. [Giger *et al.*, 1981], Wheeler y col. [Wheeler *et al.*, 1997] y Günther y col. [Günther *et al.*, 2001]. Los autores citados utilizaron columnas capilares de polaridad baja (fases fijas completamente no polares de 100% metilpolisiloxano, o de metilpolisiloxano con 5% de grupos fenilo, de polaridad levemente superior) para la separación y cuantificación de isómeros de NP [Wheeler *et al.*, 1997; Günther *et al.*, 2001] y de los etoxilatos con una y dos unidades de óxido de etileno [Giger *et al.*, 1981]. Se investigaron entonces las

separaciones con las dos clases de fases estacionarias mencionadas. Se emplearon una columna SPB-5 (5% fenil- /95% metil-polisiloxano) de 30 m x 0,25 mm y película de 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor (Supelco, Estados Unidos) y una ZB-1 (100% metil-polisiloxano) de 60 m x 0,32 mm y película de 0,50  $\mu\text{m}$  de espesor (Phenomenex, Estados Unidos). Con ambas columnas, se ensayaron diferentes condiciones de velocidad de gas portador (He), programa de temperatura y relación de división de flujo para cada uno de los analitos, y se evaluaron la resolución de isómeros de la cadena alquílica, el tiempo de corrida y la sensibilidad obtenidos.

Ambos tipos de columna, la completamente no polar y la de polaridad mayor, demostraron ser adecuadas para el análisis de los tres metabolitos de interés y no presentaron globalmente diferencias significativas, posibilitando la obtención de patrones de isómeros equivalentes. La elección final de la columna se realizó, por lo tanto, según el criterio que se explica a continuación. Cuando se utiliza espectrometría de masas para la detección, la intensidad de la señal es proporcional al número de iones formados en la fragmentación de la molécula, y ese número puede variar según las diversas configuraciones que adoptan los diferentes isómeros de los analitos. Para conocer la proporción de cada isómero individual en los estándares, es necesario hacer uso de un sistema de detección como el de ionización de llama, en el cual la respuesta es equivalente para moléculas isoméricas. Así, la cantidad relativa de cada isómero presente en los productos técnicos debía ser medida por GC-FID, para poder realizar en consecuencia calibraciones corregidas con el instrumento de GC-MS [Günther *et al.*, 2001]. Dado que no se encontraba disponible en el laboratorio una columna de tipo 5% fenilo para utilizar en el equipo de GC-FID, y sí una 100% metil-polisiloxano equivalente a la ZB-1 (columna ULTRA-1 de 60 m x 0,32 mm, con una película de fase estacionaria de 0,50  $\mu\text{m}$  de espesor, Hewlett-Packard, Estados Unidos), esta última fue la columna seleccionada. Los parámetros operacionales empleados con el GC-FID fueron equivalentes a los utilizados con el equipo de GC-MS, de modo de obtener perfiles de picos reproducibles con ambos instrumentos.

Las condiciones instrumentales seleccionadas para la medición de los tres compuestos de interés (por separado) fueron las siguientes: temperatura de inyector y detector, 300 °C; programa de temperatura del horno, (a) 80 °C (1 min) / 6 °C  $\text{min}^{-1}$  / 280 °C (5 min) para NP, y (b) 160 °C (4 min) / 3 °C  $\text{min}^{-1}$  / 280 °C (5 min) para NP1EO y NP2EO; presión de columna, 90,5 kPa; relación de división de flujo, (a) 1:10 para NP, y (b) 1:5 para NP1EO y NP2EO. Los volúmenes de inyección oscilaron entre 1,0 y 1,5  $\mu\text{l}$ .

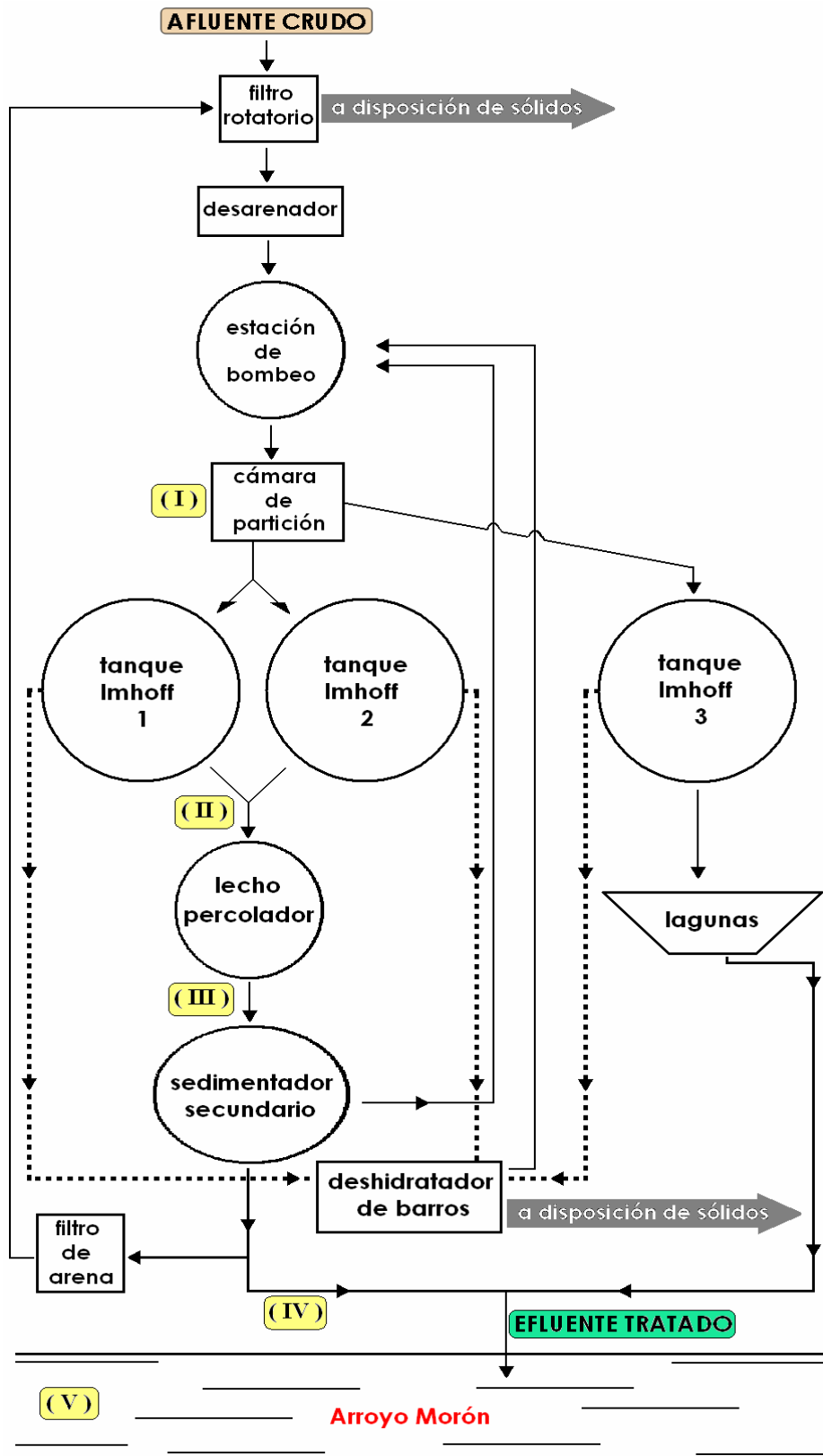
Los analitos fueron identificados y cuantificados usando el espectrómetro de masas en el modo de monitoreo de iones seleccionados (*selected ion-monitoring*, SIM) [Günther *et al.*, 2001; Fiedler *et*

*al.*, 2007]. Este es el método de elección cuando se desea detectar la presencia de un compuesto determinado con la máxima sensibilidad posible [Esteban, 1993]. Cuando se emplea el método de barrido completo (*full-scan*), el tiempo dedicado a la detección de cada fragmento de masa es una fracción pequeña del tiempo total de barrido del cuadrupolo. Si sólo se pretende detectar la presencia de uno o varios iones importantes que pueden (junto con el tiempo de retención) permitir la identificación de un compuesto, se utiliza todo el tiempo disponible por barrido en ir saltando de una a otra de las  $m/z$  seleccionadas (*peak jumping*) en lugar de enfocar también las masas en las que no se tiene interés. Este modo de detección contribuye, a la vez, a discriminar picos parcialmente superpuestos, introduciendo mejoras también en la selectividad, tal como podrá apreciarse en los cromatogramas presentados en la sección **Resultados y Discusión**.

La selección de las trazas iónicas a monitorear para cada pico isomérico se llevó a cabo corriendo los estándares de los analitos en el modo de barrido completo, tomado como premisas la exaltación de la sensibilidad y de la selectividad. Se trató de alcanzar estos objetivos eligiendo los fragmentos de masa más intensos de cada pico, a condición de que las mismas relaciones masa/carga ( $m/z$ ) no estuvieran presentes en los espectros de los ubicuamente interferentes ésteres ftálicos. La identificación positiva de los analitos en las muestras se llevó a cabo, en primera instancia, verificando la coincidencia con los tiempos de retención de los estándares. Adicionalmente, se construyó una biblioteca espectral con los espectros SIM de los estándares, y cada pico en la muestras fue chequeado en cuanto a la coincidencia del patrón de abundancia de los cuatro iones monitoreados (un ion blanco *-target ion-*, utilizado para la cuantificación, y tres iones calificativos *-qualifier ions-*). Cada pico isomérico fue cuantificado por separado; luego se sumaron las cantidades correspondientes a cada isómero, constituyendo el total de la concentración del compuesto correspondiente [Günther *et al.*, 2001; Fries y Püttmann, 2003].

### **2.3.5. MUESTREO AMBIENTAL**

Como caso de estudio, se seleccionó el ámbito de una planta de tratamiento de desechos cloacales situada en el Gran Buenos Aires, unos 23 km hacia el noroeste de la Capital Federal, en la localidad de Martín Coronado. En ella se tratan principalmente efluentes domésticos, sirviéndose a una población de 30000 habitantes. En la Figura 1 se presenta un esquema de la planta, la cual opera básicamente tal como se describe a continuación.



**Figura 1:** Esquema de la planta de tratamiento de desechos cloacales investigada. El flujo de líquidos está representado con líneas llenas, mientras que el de sólidos está representado con líneas punteadas. Con números romanos de I a V se indican los puntos muestreados.



El afluente crudo (aproximadamente 5800 m<sup>3</sup>/día) recibe un tratamiento primario que consiste en la eliminación de sólidos gruesos en un filtro rotatorio, y de partículas pesadas en un desarenador. La corriente de entrada es entonces mezclada con pequeños flujos de reciclo en una estación de bombeo, desde donde un efluente compuesto es bombeado hacia la cámara de partición. A partir de ahí, en tres tanques Imhoff tiene lugar la clarificación del líquido por sedimentación, junto con su digestión anaeróbica. Cerca del 15% de las aguas residuales es tratado en el tanque Imhoff 1, el 37% en el 2 y el 48% en el 3. A continuación, una corriente compuesta por los efluentes de los tanques 1 y 2 es sometida a tratamiento secundario en un lecho percolador, mientras que el efluente del tanque 3 es tratado en un sistema de lagunas. La corriente de salida del lecho percolador pasa a un sedimentador secundario. El líquido clarificado, junto con el agua procedente de las lagunas, constituyen el efluente tratado; este es descargado en un curso de agua natural, el arroyo Morón.

En un primer relevamiento, llevado a cabo en la primavera de 2005, se tomaron muestras en los siguientes puntos: (a) el arroyo, 100 m aguas abajo de la descarga de la planta (punto (V) en la Figura 1) y (b) el efluente a la salida del sedimentador secundario (punto (IV) en la Figura 1). En el invierno de 2006, un segundo relevamiento consistió en el muestreo de tres puntos: (a) el líquido dentro de la cámara de partición (punto (I) en la Figura 1), (b) el efluente compuesto de los tanques 1 y 2 (punto (II) en la Figura 1) y (c) el efluente del lecho percolador (punto (III) en la Figura 1).

Las muestras se colectaron con una lata de aluminio e inmediatamente se las transfirió a varias botellas de vidrio color caramelo, constituyendo así varias réplicas para cada punto de muestreo. Se les agregó entonces 1% (v/v) de formaldehído y se las almacenó a 4 °C hasta el momento del análisis.

### **2.3.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES**

***Arroyo Morón y efluente tratado (primer muestreo):*** Los estudios sobre el acondicionamiento y pre-tratamiento de las muestras, iniciados con las soluciones sintéticas, fueron completados con muestras replicadas del arroyo Morón.

En primer lugar, y siguiendo los procedimientos detallados en la *Sección 2.3.2.*, se llevó a cabo la extracción de alícuotas de 500 ml del agua del arroyo. En vista de los altos niveles de concentración encontrados para los analitos, se implementó en esta instancia una reducción del tamaño de la

muestra de 500 a 100 ml. En segundo lugar, se evaluó la extracción de 100 ml de muestra a pH natural (alrededor de 9) y a pH = 3 (ajustado con HCl). Consecutivamente, y en concomitancia con la reducción del tamaño de la muestra, se redujo la masa de fase sólida C-18 de 1 a 0,5 g y el volumen de los solventes de acondicionamiento y elución de 15 a 8 ml. Finalmente, se ensayó la re-disolución de los extractos secos en volúmenes conocidos de la mezcla de elución de HPLC, en lugar de *hexanos* puros.

Para la calibración de HPLC/fluorescencia se utilizaron mezclas estándar de *t*-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO en concentraciones entre 0,25 y 3 mg/l. Se registraron las áreas cromatográficas y se calcularon las concentraciones de los analitos en los extractos. Los porcentajes de recuperación reales se midieron adicionando cantidades conocidas de los analitos a alícuotas de 100 ml de muestra, en dos niveles de concentración: i) 0,008, 0,006 y 0,005 mg/l y ii) 0,036, 0,031 y 0,025 mg/l para NP1EO, NP2EO y NP, respectivamente.

Subsecuentemente, se analizaron alícuotas de 50 y 100 ml del efluente tratado del sedimentador secundario. Todas las réplicas fueron ajustadas a pH 3 con HCl, extraídas sobre 0,5 g de fase sólida C-18 y eluidas con 8 ml de EtAc. La re-disolución de los residuos de evaporación se llevó a cabo en 4,1% 2-PrOH en *hexanos*. Las concentraciones de los analitos en los extractos se calcularon del mismo modo que para el arroyo Morón. Las tasas de recuperación reales se midieron a través de la adición de los analitos en tres niveles de concentración, a saber: i) 0,004, 0,004 y 0,003, ii) 0,011, 0,009 y 0,008, y iii) 0,022, 0,019 y 0,016 mg/l para NP1EO, NP2EO y NP, respectivamente.

Las fracciones correspondientes a los tres compuestos de interés en varias réplicas de ambas muestras fueron colectadas, evaporadas, re-disueltas e inyectadas en el instrumento de GC- MS.

***A lo largo del tratamiento (segundo muestreo):*** Las muestras de la cámara de partición, del efluente compuesto de los tanques Imhoff y del sobrenadante del lecho percolador, se procesaron de la misma manera que la del sedimentador secundario. Los extractos concentrados fueron analizados por HPLC utilizando elución con gradiente.

Si bien el interés se centró en la cuantificación de los metabolitos estrogénicos, también revestía importancia la forma en que el perfil de oligómeros se iba modificando a lo largo de los diferentes estadios del tratamiento (tal como se había estudiado en los reactores biológicos a escala de laboratorio, Capítulos 2 y 3 de esta tesis). Se realizaron entonces algunos ensayos de recuperación adicionales, con el objeto de evaluar la homogeneidad en la extracción de los etoxímeros superiores con el método de enriquecimiento desarrollado. Para ello, se prepararon dos muestras de NP10EO

en agua *nanopure*, una de concentración menor y otra de concentración mayor que la *concentración micelar crítica* del tensioactivo (la CMC del NP10EO a 25 °C es  $7,5 \times 10^{-5}$  M) [Rosen, 1989], y se procesaron y analizaron del mismo modo que las muestras del segundo relevamiento.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE BLANCOS Y MUESTRAS MODELO**

Dentro de los solventes de elución compatibles con materiales de fase inversa, los más comúnmente empleados son el metanol, el acetonitrilo y el acetato de etilo [Thurman y Mills, 1998]. Entre ellos, se optó por utilizar al acetato de etilo (EtAc) para la elución de los productos de degradación fuertemente lipofílicos en estudio. Por ser el menos polar entre los tres solventes mencionados, se esperaba la obtención de extractos más limpios, ya que compuestos orgánicos muy polares o incluso iónicos no deberían ser eluidos eficientemente de la fase sólida (en un principio se había pensado en llevar a un extremo estas características de selectividad empleando para la elución un solvente aún más lipofílico, el hexano, pero su alta hidrofobicidad le impidió establecer un contacto íntimo con la superficie de la sílice que constituye la base del relleno de la columna de extracción [Thurman y Mills, 1998], dando lugar a una pobrísima recuperación de los analito, por lo que fue descartado).

En primer lugar, se estudió si existía la necesidad de efectuar un secado de la fase sólida antes de la elución, comparando la recuperación de los analitos para un conjunto de columnas que fueron sometidas a 3 horas de secado, con la obtenida para un segundo grupo que no fue secado en absoluto luego del pasaje de la muestra. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron prácticamente los mismos en ambos casos, resultado que podría atribuirse al hecho de que, si bien el agua es muy poco soluble en acetato de etilo, este solvente (a diferencia de lo que ocurría con el hexano) sí es capaz de desplazar a las moléculas de agua de los poros, y así interactuar con todas las áreas de la superficie de la sílice [Thurman y Mills, 1998]. Finalmente se incluyó en el protocolo un paso de secado de 20-30 minutos de duración, ya que de otro modo (es decir, si no se

secaba para nada el sorbente) los tiempos requeridos para la percolación del solvente de elución por gravedad se tornaban sumamente largos.

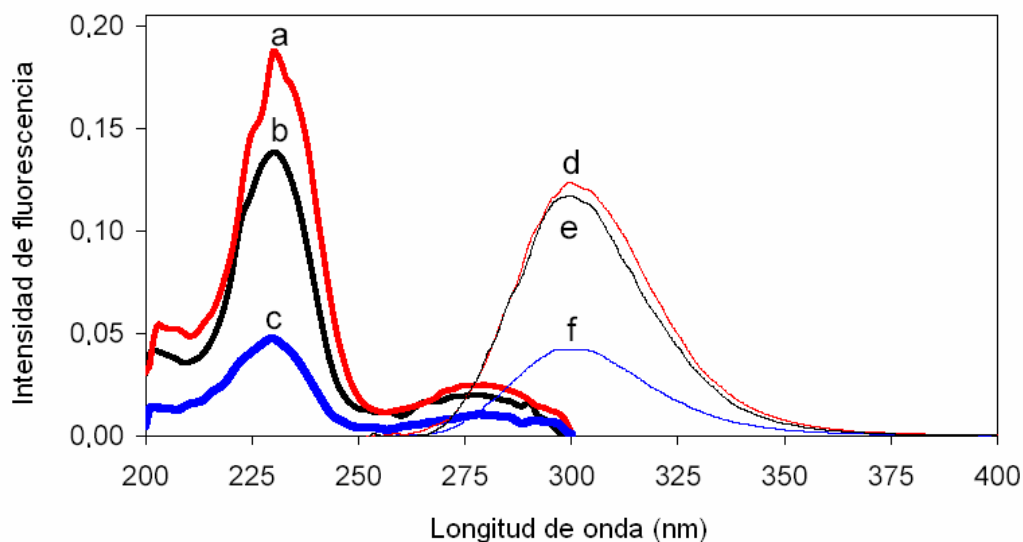
Por otra parte, se encontró que la única contribución significativa a la señal del blanco provenía del agua *nanopure* empleada para construir las muestras modelo. Luego de extraer 500 ml del agua producida en el laboratorio y concentrarla 500-1000 veces, los cromatogramas de HPLC mostraron una serie de picos en la zona de los analitos. Si bien esos compuestos no fueron identificados, es probable que se tratara de trazas de aditivos de los materiales plásticos que constituyen la unidad de purificación de agua. Aún así, la evaluación de la recuperación de los analitos no se vio afectada al nivel de concentración estudiado. Ninguno de los otros pasos del procedimiento de enriquecimiento de las muestras (los cuales serían de hecho los únicos pasos reales en el análisis de muestras ambientales) introdujo sustancias interferentes en niveles detectables.

La recuperación de los tres analitos se encontró alrededor del 80%, con desviaciones estándar relativas menores que el 10% para 4 extracciones repetidas. Así, el procedimiento de enriquecimiento en su conjunto se consideró adecuado, en principio, para propósitos de cuantificación.

### **3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA**

Tal como ha sido discutido en el Capítulo 3, las condiciones cromatográficas seleccionadas permitieron la resolución completa de los metabolitos persistentes 4-NP2EO, 4-NP1EO y 4-NP (y el compuesto minoritario asociado 2-NP) en menos de 20 minutos de corrida isocrática.

En cuanto a la detección de fluorescencia, los espectros de excitación y emisión de dichos metabolitos, registrados respectivamente para longitudes de onda de emisión y excitación de 300 y 230 nm, se muestran en la Figura 2. Los tres compuestos exhibieron máximos de emisión alrededor de los 300 nm y las mejores longitudes de onda de excitación estuvieron alrededor de los 230 nm. Por consiguiente, la linealidad, la repetibilidad y los límites de detección del método (los cuales habían sido previamente estudiados para la detección por absorción UV a 277 nm) fueron evaluados para dicho par de longitudes de onda de fluorescencia.

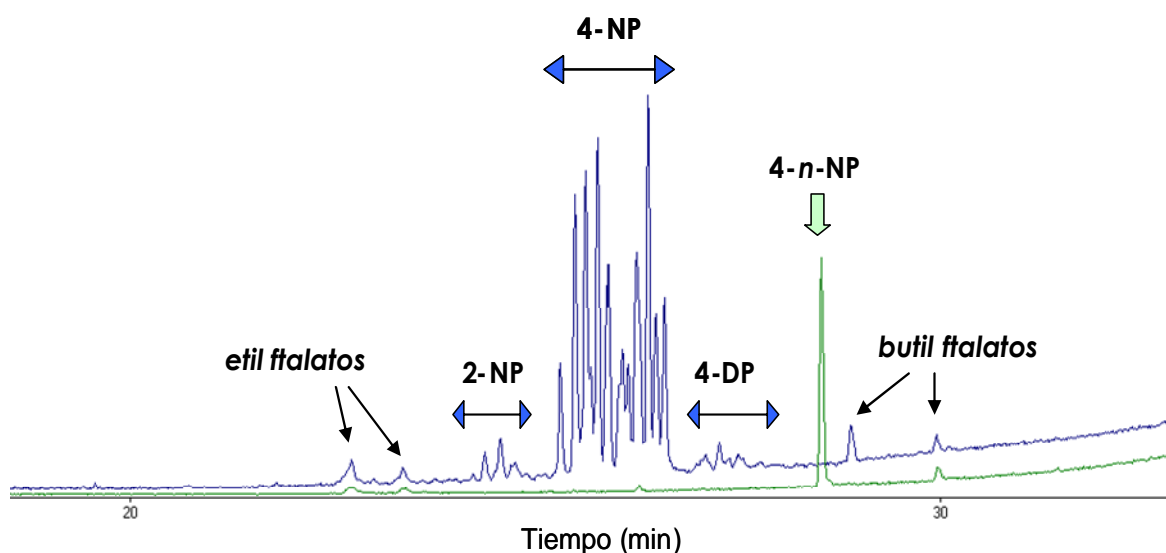


**Figura 2:** Espectros de fluorescencia de los analitos. (a), (b) y (c): espectros de excitación, y (d), (e) y (f): espectros de emisión de 4-NP2EO, 4-NP1EO y 4-NP, respectivamente. Cantidades inyectadas: 100  $\mu$ l de soluciones 0,1 mg/l de los compuestos individuales. Eluyente: 4,1% 2-PrOH en *hexanos*. Caudal: 0,65 ml/min. Temperatura: 35  $^{\circ}$ C.

Se obtuvo para todos los compuestos una buena precisión, con %RSD menores que 7% para las áreas de pico y menores que 1% para los tiempos de retención (calculadas a partir de 10 inyecciones repetidas de 50  $\mu$ l de una mezcla de 0,05 mg/l de cada compuesto). Los coeficientes de correlación lineal ( $R$ ) fueron siempre mayores que 0,999 para las curvas de calibración construidas para área de pico, a niveles de concentración entre 0,01 y 1,50 mg/l. Los límites de detección, estimados como la concentración correspondiente a una señal igual a  $B + 3 \sigma_B$  (donde  $B$  y  $\sigma_B$  son el promedio y la desviación estándar de la señal del blanco para 10 inyecciones de 50  $\mu$ l del solvente) resultaron 0,8  $\mu$ g/l para 4-NP1EO y 4-NP2EO, y 1,3  $\mu$ g/l para *t*-NP. Así, el método cromatográfico acoplado a detección de fluorescencia alcanzó, en principio, los atributos necesarios para la determinación de los analitos en los niveles de concentración usualmente encontrados en el ambiente, luego de un enriquecimiento apropiado de las muestras acuosas. Teniendo en cuenta que factores de enriquecimiento de hasta 1000 (o incluso superiores) son razonables y prácticamente factibles, puede decirse que los límites instrumentales alcanzados sobrepasan los requerimientos para el monitoreo ambiental de aguas moderadamente contaminadas (en las cuales las concentraciones de los analitos se encuentran en el orden de los  $\mu$ g/l), y alcanzan bien los requerimientos para el análisis de aguas con grados de contaminación leves (en el orden de los ng/l) [Thiele *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 2002].

### 3.3. CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la Figura 3 se exponen los resultados obtenidos con el método seleccionado para la determinación de *t*-NP, empleando el espectrómetro de masas en el modo de barrido completo. Con este modo de detección se obtuvo para el 4-NP un perfil compuesto por 14 picos, cada uno de ellos correspondiente, en principio, a uno o más compuestos isoméricos. Hacia ambos lados de la señal compleja del 4-NP, pueden apreciarse sendos patrones de picos atribuibles a productos secundarios asociados. A la izquierda del 4-NP se detectaron isómeros de 2-nonilfenol y a la derecha se observaron isómeros de 4-decilfenol. Por otra parte, se observó a la mezcla de isómeros ramificados que componen al analito claramente resuelta del compuesto de cadena lineal (4-*n*-NP), ofreciendo una buena alternativa ante la eventual necesidad de utilizar un estándar interno. Finalmente, cabe señalar que los compuestos de interés se encontraron bien resueltos de varios ésteres ftálicos; este tipo de compuestos, pertenecientes a una familia de plastificantes ampliamente utilizada en los productos plásticos que nos rodean, aparece como una interferencia casi omnipresente cuando se desea determinar sustancias a nivel de trazas por cromatografía gaseosa.



**Figura 3:** Cromatogramas de barrido completo. *Trazo verde:* inyección de 2  $\mu$ l de 4-*n*-NP 10 mg/l en ciclohexano. *Trazo azul:* inyección de 2  $\mu$ l de *t*-NP 100 mg/l. Los grupos de picos señalados como 2-NP, 4-NP y 4-DP son, respectivamente, isómeros de *orto*-nonilfenol, *para*-nonilfenol y *para*-decilfenol.

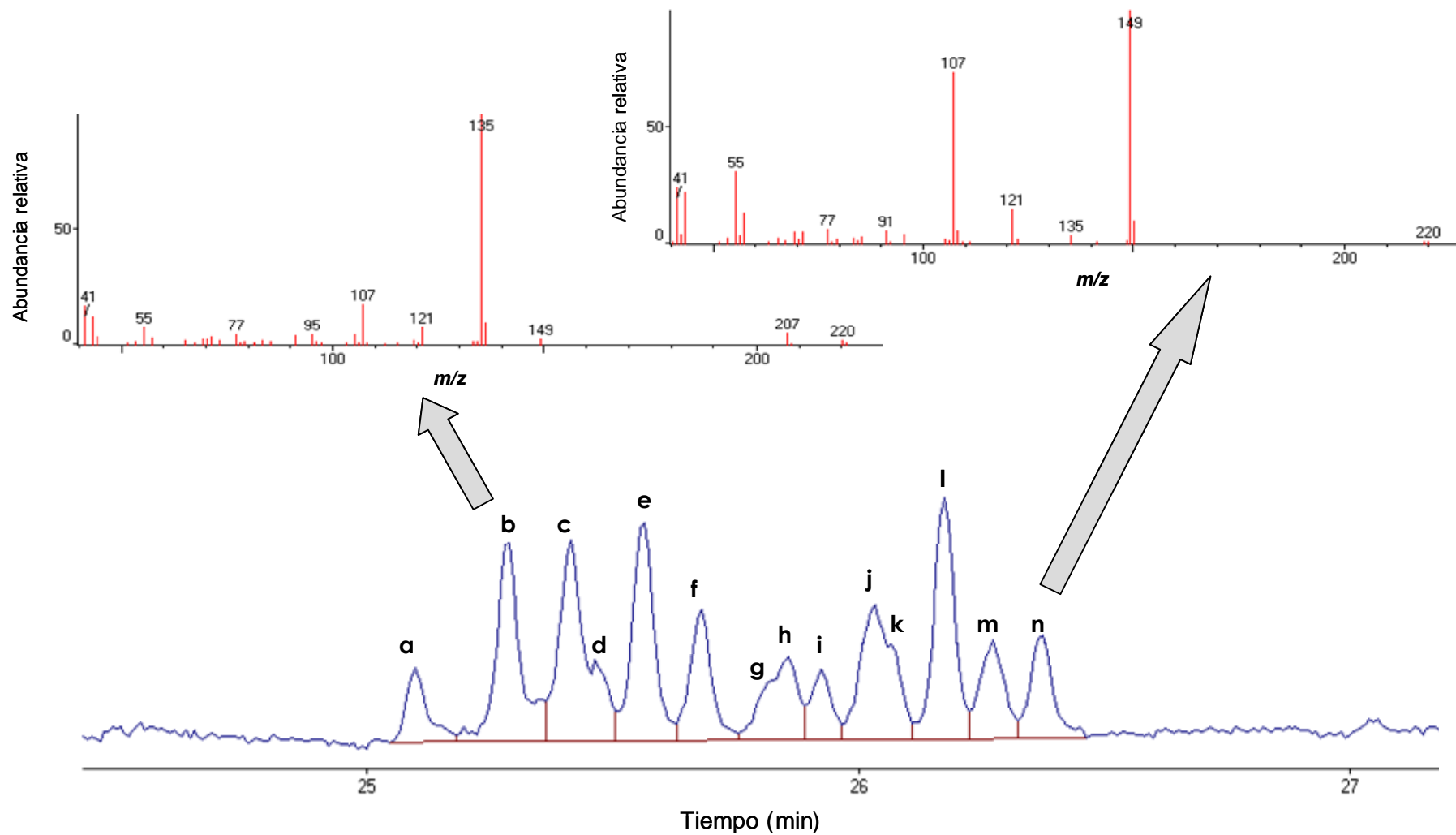
Las tres figuras que siguen muestran en forma extendida las señales correspondientes a la separación de isómeros de 4-NP (Figura 4), 4-NP1EO (Figura 5) y 4-NP2EO (Figura 6) en el modo de barrido completo, empleando los métodos respectivamente seleccionados; se incorporaron en ellas los espectros de masas del segundo y el último de los picos discernibles en los cromatogramas.

Los iones mayoritarios de todos los picos separados se presentan en la Tabla 1, junto con los de los ésteres ftálicos encontrados durante diversas inyecciones de soluciones estándar de los analitos.

**Tabla 1**

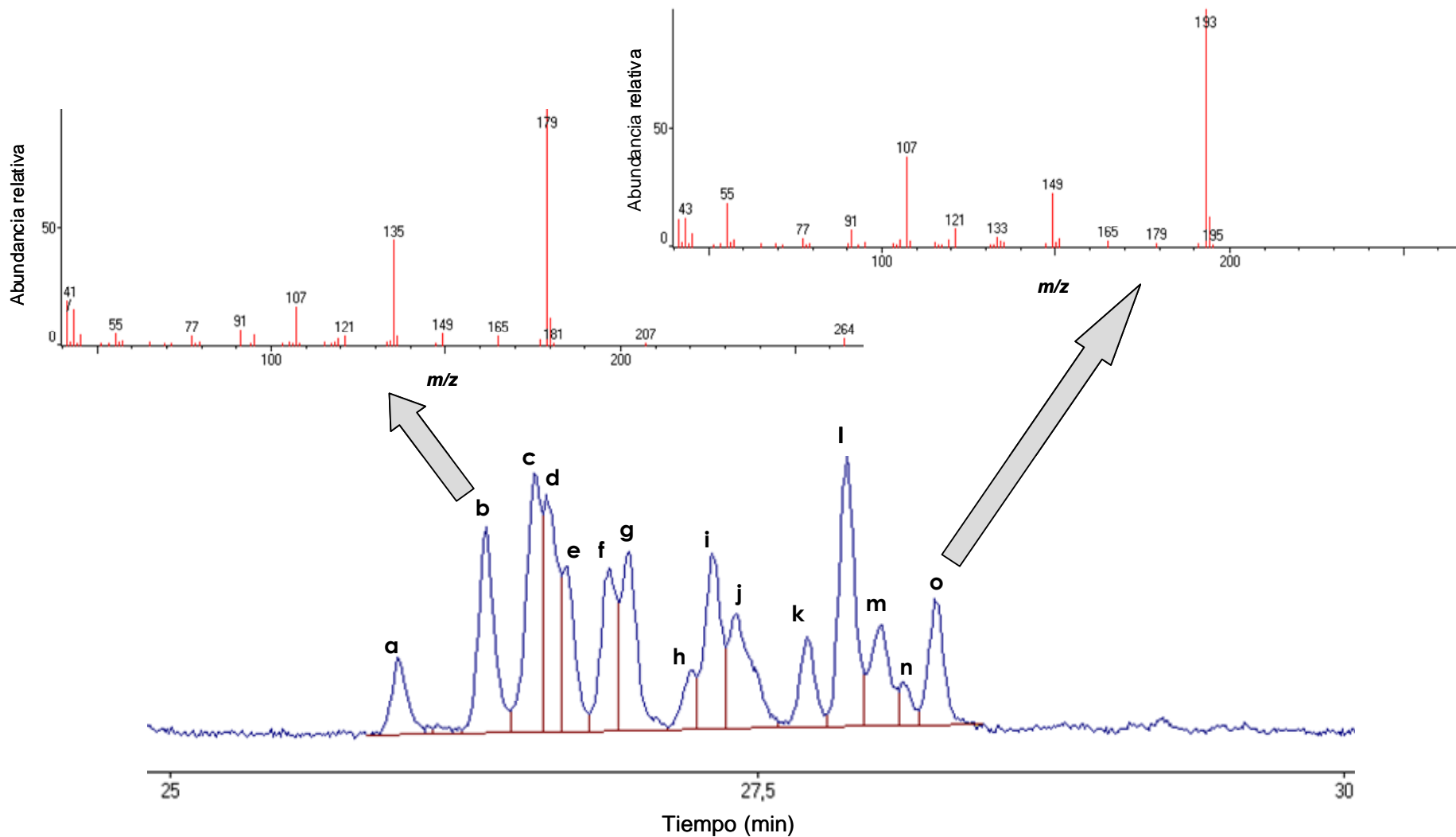
<i>Pico isomérico</i>	<i>m/z</i>		
	<b>4-NP</b>	<b>4-NP1EO</b>	<b>4-NP2EO</b>
<b>a</b>	<u>121</u> , 107, 163, 135	<u>165</u> , 207, 121, 107	<u>207</u> , 121, 251, 107
<b>b</b>	<u>135</u> , 107, 121, 207	<u>179</u> , 135, 107, 149, 165	<u>223</u> , 135, 207, 107, 149
<b>c</b>	<u>107</u> , 149, 135, 121, 191	<u>193</u> , 107, 179, 165, 149	<u>223</u> , 237, 135, 107
<b>d</b>	<u>135</u> , 107, 121, 207	<u>179</u> , 135, 107, 193	<u>223</u> , 135, 237, 107, 207
<b>e</b>	<u>135</u> , 121, 107, 149	<u>193</u> , 165, 107, 121, 149	<u>223</u> , 135, 237, 107
<b>f</b>	<u>121</u> , 149, 107, 135	<u>179</u> , 135, 107, 165	<u>223</u> , 135, 207, 107
<b>g</b>	<u>107</u> , 121, 135, 163	<u>193</u> , 165, 107, 179, 121	<u>237</u> , 107, 121, 251
<b>h</b>	<u>135</u> , 107, 121	<u>207</u> , 107, 165, 121, 221	<u>251</u> , 107, 121, 135, 223
<b>i</b>	<u>107</u> , 121, 163, 135	<u>179</u> , 107, 135, 207	<u>237</u> , 223, 107, 135
<b>j</b>	<u>107</u> , 149, 121, 163, 135	<u>193</u> , 107, 149, 121, 165	<u>251</u> , 223, 107, 121, 135
<b>k</b>	<u>107</u> , 121, 163, 149	<u>207</u> , 107, 121, 165, 179	<u>223</u> , 135, 237, 107
<b>l</b>	<u>135</u> , 107, 121	<u>179</u> , 135, 107, 193	<u>223</u> , 135, 107, 237, 121
<b>m</b>	<u>107</u> , 135, 149, 121	<u>193</u> , 107, 179, 149, 165	<u>237</u> , 107, 149, 107
<b>n</b>	<u>149</u> , 107, 121, 135	<u>179</u> , 135, 107, 149, 165	-
<b>o</b>	-	<u>193</u> , 107, 149, 121	-
<b>Ftalatos</b>	<u>149</u> – 121 – 207 – 177		

Para cada pico isomérico, se encuentra subrayado el pico base del espectro de masas

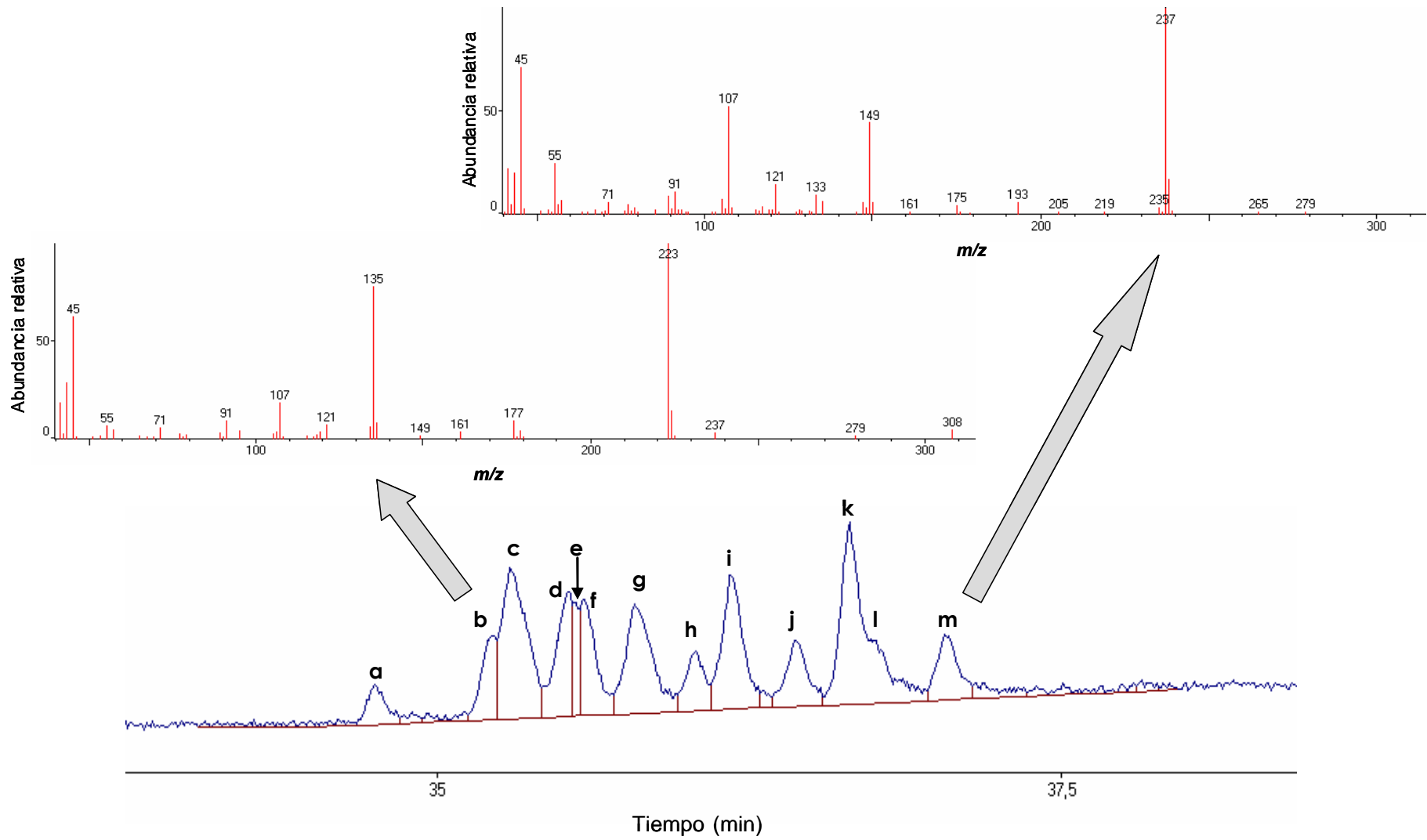


**Figura 4:** Cromatograma de corriente iónica total (TIC) de 4-NP 100 mg/l. Las flechas señalan los espectros de masas de barrido completo de dos de los picos. La relación  $m/z$  del ion molecular es 220.





**Figura 5:** Cromatograma de corriente iónica total (TIC) de 4-NP1EO 132 mg/l. Las flechas señalan los espectros de masas de barrido completo de dos de los picos. La relación  $m/z$  del ion molecular es 264.



**Figura 6:** Cromatograma de corriente iónica total (TIC) de 4-NP2EO 119 mg/l. Las flechas señalan los espectros de masas de barrido completo de dos de los picos. La relación  $m/z$  del ion molecular es 308.

El análisis de los espectros de masas de los isómeros separados y de los ftalatos permitió seleccionar los iones más abundantes de los compuestos de interés que no coincidieran con los provenientes de la fragmentación característica de la familia de sustancias interferentes. En base a esta selección se desarrolló el método SIM. Se monitorearon cuatro trazas iónicas para cada uno de los analitos, y se eligió entre ellas un ion para la cuantificación (*ion blanco*), mientras que los tres iones restantes se utilizaron para completar la identificación del compuesto (*iones calificativos*). En el caso del 4-NP las *m/z* monitoreadas fueron 107, 135, 163 y 220 ( $M^+$ ); en el caso del 4-NP1EO se monitorearon las *m/z* 179, 193, 107 y 165; en cuanto al 4-NP2EO, las *m/z* monitoreadas fueron 223, 135, 237 y 251.

Los iones blanco elegidos para la cuantificación isómero-selectiva se muestran en la Tabla 2. En la misma tabla se encuentran las proporciones calculadas para los picos separados por GC capilar utilizando detección de ionización de llama; algunos de los picos visualmente distinguibles no pudieron ser integrados separadamente por el instrumento, por lo que se los cuantificó sumados, tal como se indica entre paréntesis en la tabla.

**Tabla 2.** Relación *m/z* de los iones blanco seleccionados para la determinación de los distintos isómeros por GC-MS; y proporción de isómeros en los productos comerciales utilizados como estándares de los analitos, tal como se las determinó por GC-FID

Número de pico isomérico	GC-MS			GC-FID		
	Ion blanco de NP	Ion blanco de NP1EO	Ion blanco de NP2EO	% de NP en el estándar	% de NP1EO en el estándar	% de NP2EO en el estándar
1	163	165	251	5,3	4,2	5,2
2	135	179	223	10,6	6,8	5,6
3	107	193	237	12,2	9,5	18,5 (3+4)
4	135	179	223	3,3	16,0	-
5	135	193	223	12,4	6,4	17,8 (5+6+7)
6	107	179	237	7,4	6,4	-
7	163	193	223	2,6 (7+8)	7,5	-
8	135	165	237	-	3,1 (8+9)	11,3 (8+9)
9	163	179	251	4,3	-	-
10	107	193	251	4,0	7,2 (10+11)	4,3
11	163	165	223	12,6	-	11,2 (11+12)
12	135	107	237	13,2	7,1	-
13	107	179	251	5,9	4,3	5,0
14	107	107	223	6,3	9,4	16,0
15	-	179	237	-	6,8	5,1
16	-	193	-	-	5,4	-

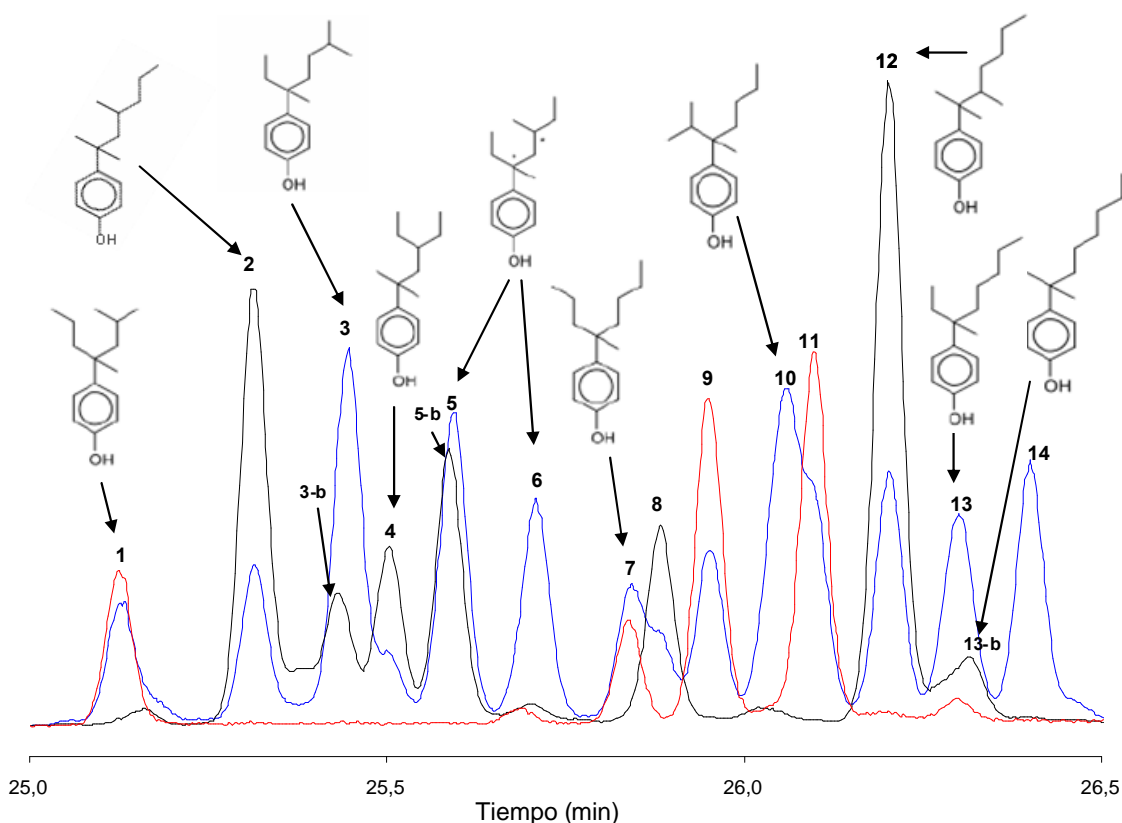
Los números asignados a los picos isoméricos se correlacionan con los de las Figuras 9, 10 y 11.

En todos los casos, los métodos SIM permitieron distinguir al menos 14 picos isoméricos (ver Figuras 9, 10 y 11), dando origen a huellas digitales características, apropiadas para la identificación certera de los analitos. Por otra parte, los límites de detección (como suma de isómeros) resultaron de 0,1 µg/ml para NP, 0,2 µg/ml para NP1EO y 0,3 µg/ml para NP2EO.

La elucidación de las estructuras ramificadas a partir de los espectros de masas de los picos separados se encuentra más allá del alcance de esta tesis. Sin embargo, en base a estudios llevados a cabo con profundidad por otros autores bajo condiciones cromatográficas similares en el caso particular del nonilfenol, es posible correlacionar los picos separados y realizar una asignación de estructuras en forma parcial para este analito [Fries y Püttmann, 2003; Thiele *et al.*, 2004].

La caracterización estructural de los isómeros reviste cada vez más interés [Moeder *et al.*, 2006]. Así como las diferencias estructurales entre los distintos alquilfenoles afecta su actividad estrogénica, pueden esperarse efectos similares para isómeros de un mismo alquilfenol con diferentes ramificaciones. El análisis de mezclas técnicas de 4-NP por GC-MS ha permitido la clasificación de los isómeros en varios grupos, aunque la asignación de estructuras se limitó por mucho tiempo a la caracterización de los carbonos  $\alpha$ - y  $\beta$ - de la cadena alquílica [Giger *et al.*, 1981; Wheeler *et al.*, 1997]. Recientemente, Thiele y col. [Thiele *et al.*, 2004] separaron y caracterizaron por GC-MS isómeros de NP de un producto comercial siguiendo los procedimientos de Wheeler y col. [Wheeler *et al.*, 1997]; clasificaron en 6 grupos los compuestos con espectros de masas idénticos y, basados en las estructuras propuestas para cada grupo, sintetizaron numerosos isómeros y los utilizaron para la confirmación unívoca de 11 de los componentes del 4-NP técnico. Los autores citados utilizaron la misma clase de columna que la empleada en este trabajo de tesis, aunque de longitud mayor; sin embargo, aplicando el modo de monitoreo de iones seleccionados nos fue posible diferenciar prácticamente el mismo número de picos que Thiele y col., distribuidos en un patrón claramente comparable. Por ello, la asignación de estructuras a los picos discriminados en este estudio fue realizada en su totalidad siguiendo los resultados de dichos autores.

En la Figura 7 se presenta la asignación de estructuras para 11 de los 15 isómeros que se pudo distinguir. Los isómeros numerados 5 y 6, que resultaron bien separados en el cromatograma, son diastereómeros. Es interesante notar en esta figura cómo la secuencia de elución presenta una tendencia hacia tiempos de retención crecientes cuando la ramificación de la cadena alquílica disminuye (este hecho se presenta en forma exacerbada para el compuesto completamente lineal, 4-*n*-NP, tal como se observó en la Figura 3).



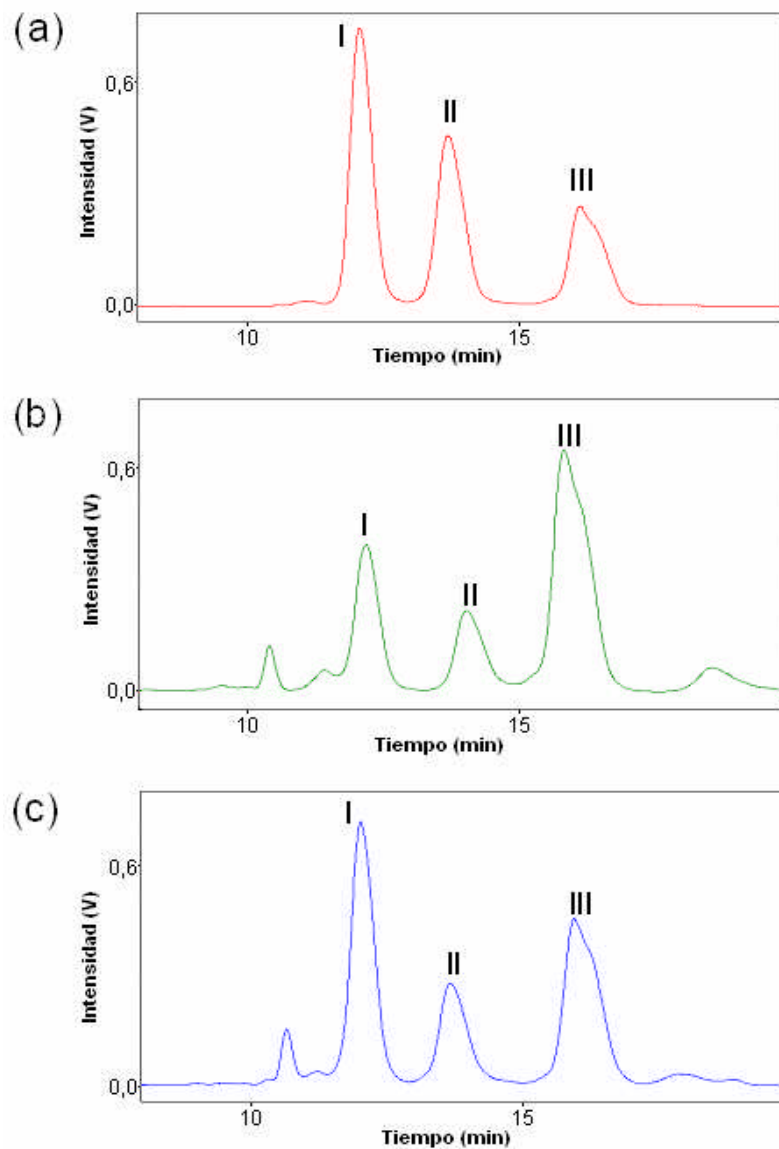
**Figura 7:** Asignación de estructuras isoméricas para el NP empleado en este estudio, en base a los resultados de Thiele y col. [Thiele *et al.*, 2004] (los picos numerados 3-b, 5-b y 13-b no fueron tenidos en cuenta para la cuantificación). Los colores de las líneas para las diferentes trazas iónicas monitoreadas con el método SIM son:  $m/z$  107 (azul),  $m/z$  135 (negro) y  $m/z$  163 (rojo).

Finalmente, vale la pena destacar que los espectros de masas de los dos picos señalados sucesivamente en las Figuras 4, 5 y 6 presentan picos mayoritarios para relaciones  $m/z$  que difieren en 44 unidades, es decir, en la masa de un grupo etoxilo. Esto parece indicar que, para cada etoxímero superior, los isómeros separados se correlacionan con los del etoxímero inferior en cuanto al orden de elución, a la vez que se mantiene en un mismo sitio de la cadena alquílica la ruptura más favorecida. Esta característica se encontró también en los espectros de masas de los demás picos, lo que junto con una observación minuciosa de los perfiles de picos en los cromatogramas SIM (los cuales presentan mejor resolución de picos que los de barrido completo) conduciría a la conclusión de que es posible correlacionar los picos y por ende las estructuras ramificadas del 4-NP con las correspondientes a 4-NP1EO y 4-NP2EO [Giger *et al.*, 1981].

### 3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES

#### 3.4.1. ARROYO MORÓN Y EFLUENTE TRATADO (*PRIMER MUESTREO*)

En la Figura 8 se reúnen cromatogramas de HPLC registrados a partir de inyecciones de una mezcla estándar de los analitos, el extracto de la muestra del efluente secundario y el extracto de la muestra del arroyo Morón (ambas muestras con un factor de concentración igual a 100).



**Figura 8:** Cromatogramas de HPLC de (a) una mezcla estándar de 1,25 mg/l de t-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, (b) el extracto de la muestra del efluente secundario ( $f_c = 100$ ) y (c) el extracto de la muestra del arroyo Morón ( $f_c = 100$ ). Los números romanos sobre los picos indican: (I) 4-NP1EO,

(II) 4-NP2EO y (III) 4-NP. Longitud de onda de excitación: 230 nm, longitud de onda de emisión: 300 nm; fase móvil: 4,1% 2-PrOH en *hexanos*, caudal: 0,65 ml/min; temperatura de la columna: 35 °C.

Puede apreciarse en la figura que para las dos muestras se obtuvieron cromatogramas bien resueltos y con formas de picos similares a la de los estándares.

Los resultados cuantitativos obtenidos para el arroyo Morón bajo las diferentes condiciones de tratamiento de la muestra descritas en *Procedimientos, Sección 2.3.6.* se presentan en la Tabla 3. Con respecto a la performance del método, cabe resaltar que para un total de 14 extracciones se obtuvieron desviaciones estándar relativas de alrededor del 10% para las concentraciones de todos los analitos luego del enriquecimiento. No se observaron variaciones en los valores de concentración resultantes ni en la apariencia de los cromatogramas al cambiar ninguna de las variables investigadas (volumen extraído y pH de la muestra, masa de fase sólida, volumen de acetato de etilo y composición del solvente de re-disolución del extracto seco), dando cuenta de la robustez de la metodología desarrollada. En cuanto a la acidificación de la muestra y la re-disolución del extracto en presencia de un solvente de polaridad mayor, ambos contribuyeron a la obtención de soluciones más límpidas, más apropiadas para la inyección en HPLC. Por esa razón, las condiciones finalmente seleccionadas para el tratamiento de la muestra involucraron el ajuste a pH 3 previo a la extracción, y la re-disolución del extracto seco en 4,1% 2-PrOH en *hexanos*. Los porcentajes de recuperación, calculados para muestras adicionadas con cantidades conocidas de los analitos, resultaron 85% para NP1EO y NP2EO, y 74% para NP.

En la Tabla 4 se exhiben resultados de la cuantificación de la muestra del efluente tratado. En este caso, para un número de 6 determinaciones sucesivas de la concentración (incluyendo tamaños de muestra de 50 y 100 ml) se alcanzaron desviaciones estándar relativas menores que el 6%. Del mismo modo que con la muestra del arroyo Morón, se calcularon los porcentajes de recuperación de los analitos a partir de su adición estándar, resultando 91, 85 y 73% para NP1EO, NP2EO y NP, respectivamente.

**Tabla 3.** Concentraciones medidas para la muestra del arroyo Morón luego del enriquecimiento ( $f_c = 100$ ). Las réplicas representan a la misma muestra guardada en diferentes recipientes.

Número de réplica	Volumen de muestra (ml)	pH de la muestra	Masa de sorbente de SPE (mg)	Volumen de solvente de elución de SPE (ml)	Solvente de re-disolución del extracto	Concentración de NP1EO (mg/l)	Concentración de NP2EO (mg/l)	Concentración de NP (mg/l)
I	500	9	1000	15	<i>Hexanos</i>	1,42	0,55	1,89
I	100	9	1000	15	<i>Hexanos</i>	1,33	0,60	2,04
II	100	9	1000	15	<i>Hexanos</i>	1,37	0,58	2,39
I	100	3	1000	15	<i>Hexanos</i>	1,12	0,47	1,77
II	100	3	1000	15	<i>Hexanos</i>	1,28	0,53	2,05
I	100	3	500	8	<i>Hexanos</i>	1,40	0,52	2,17
II	100	3	500	8	<i>Hexanos</i>	1,29	0,58	2,02
I	100	3	500	8	<i>Hexanos</i>	1,15	0,49	1,84
I	100	3	500	8	4,1% 2-PrOH en <i>hexanos</i>	1,05	0,46	1,82
II	100	3	500	8	<i>Hexanos</i>	1,08	0,41	1,73
II	100	3	500	8	4,1% 2-PrOH en <i>hexanos</i>	1,33	0,58	2,08
I	100	3	500	8	<i>Hexanos</i>	1,20	0,51	1,85
II	100	3	500	8	4,1% 2-PrOH en <i>hexanos</i>	1,47	0,57	2,31
II	100	3	500	8	4,1% 2-PrOH en <i>hexanos</i>	1,35	0,54	2,02
<b>Promedio</b>						<b>1,27</b>	<b>0,53</b>	<b>2,00</b>
<b>%RSD</b>						<b>10,4</b>	<b>10,4</b>	<b>9,9</b>



**Tabla 4.** Concentraciones medidas para la muestra del sedimentador secundario luego del enriquecimiento ( $f_c = 100$ ). Las réplicas representan a la misma muestra guardada en diferentes recipientes.

Número de réplica	Volumen de muestra (ml)	Concentración de NP1EO (mg/l)	Concentración de NP2EO (mg/l)	Concentración de NP (mg/l)
I	50	0,74	0,63	2,64
II	50	0,70	0,60	2,51
I	100	0,78	0,66	2,60
II	100	0,80	0,67	2,68
III	100	0,74	0,60	2,42
IV	100	0,73	0,59	2,39
<b>Promedio</b>		<b>0,75</b>	<b>0,62</b>	<b>2,54</b>
<b>%RSD</b>		<b>5,0</b>	<b>5,6</b>	<b>4,7</b>

Los niveles originales de los metabolitos lipofílicos en las muestras acuosas (calculados a partir de los promedios de las Tablas 3 y 4, teniendo en cuenta el factor de concentración y los porcentajes de recuperación reales) fueron entonces, para NP1EO, NP2EO y NP, respectivamente, 8, 7 y 35  $\mu\text{g/l}$  en el efluente, y 15, 6 y 27  $\mu\text{g/l}$  en el arroyo. En términos generales, se puede decir que estos valores son consistentes con aquéllos reportados en otros países a lo largo de las últimas décadas [Thiele *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 2002]. Son todos ecológicamente relevantes si se considera la posibilidad de bio-acumulación y, en el caso del nonilfenol, los niveles medidos se ubican en el extremo superior del intervalo de concentraciones reportadas en la literatura, con valores que están bien por encima del umbral de inducción de vitelogenina (un marcador usual de actividad estrogénica) en una variedad de organismos acuáticos [Thiele *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001; Vitali *et al.*, 2004].

Por otra parte, las concentraciones encontradas en los dos tipos de muestras fueron similares, denotando la ausencia de un efecto de dilución desde el punto de descarga de la planta a lo largo de los 100 m del curso de agua receptor, y dando así cuenta del impacto que la descarga de compuestos bio-refractarios puede tener en el ambiente. Para alcanzar una mejor comprensión del significado de las concentraciones medidas, se las puede contrastar con los límites que ciertos países han establecido para la preservación del ambiente acuático. Por ejemplo, los niveles guía de NP para la protección de la vida acuática en Canadá son de 6  $\mu\text{g/l}$  (regulación de la provincia de

Québec) y de 1 µg/l (regulación nacional) [Berryman *et al.*, 2004]. En Holanda, las concentraciones máximas permisibles (MPCs) en aguas superficiales y subterráneas son de 0,33 y 0,11 µg/l para NP y NP1EO+NP2EO, respectivamente [Van Vlaardingen *et al.*, 2003].

Los límites de detección del método completo, calculados para un tamaño de muestra de 100 ml, un factor de enriquecimiento (definido como la relación entre el volumen de muestra y el volumen de re-disolución del extracto) de 100 y una recuperación promedio de 80%, resultaron de aproximadamente 0,013 µg/l para cada uno de los analitos (considerando un límite de detección instrumental promedio de 1 µg/l). Ya que la cantidad de muestra extraída puede aumentarse y el volumen final del extracto reducirse de acuerdo con los niveles de analitos presentes, podrían obtenerse factores de enriquecimiento 10-50 veces mayores que los de este trabajo, permitiendo de ese modo la determinación de los xenobióticos aún en niveles de concentración tan bajos como los que se han reportado para muestras de agua corriente (en el orden de los 0,001 µg/l) [Thiele *et al.*, 1997].

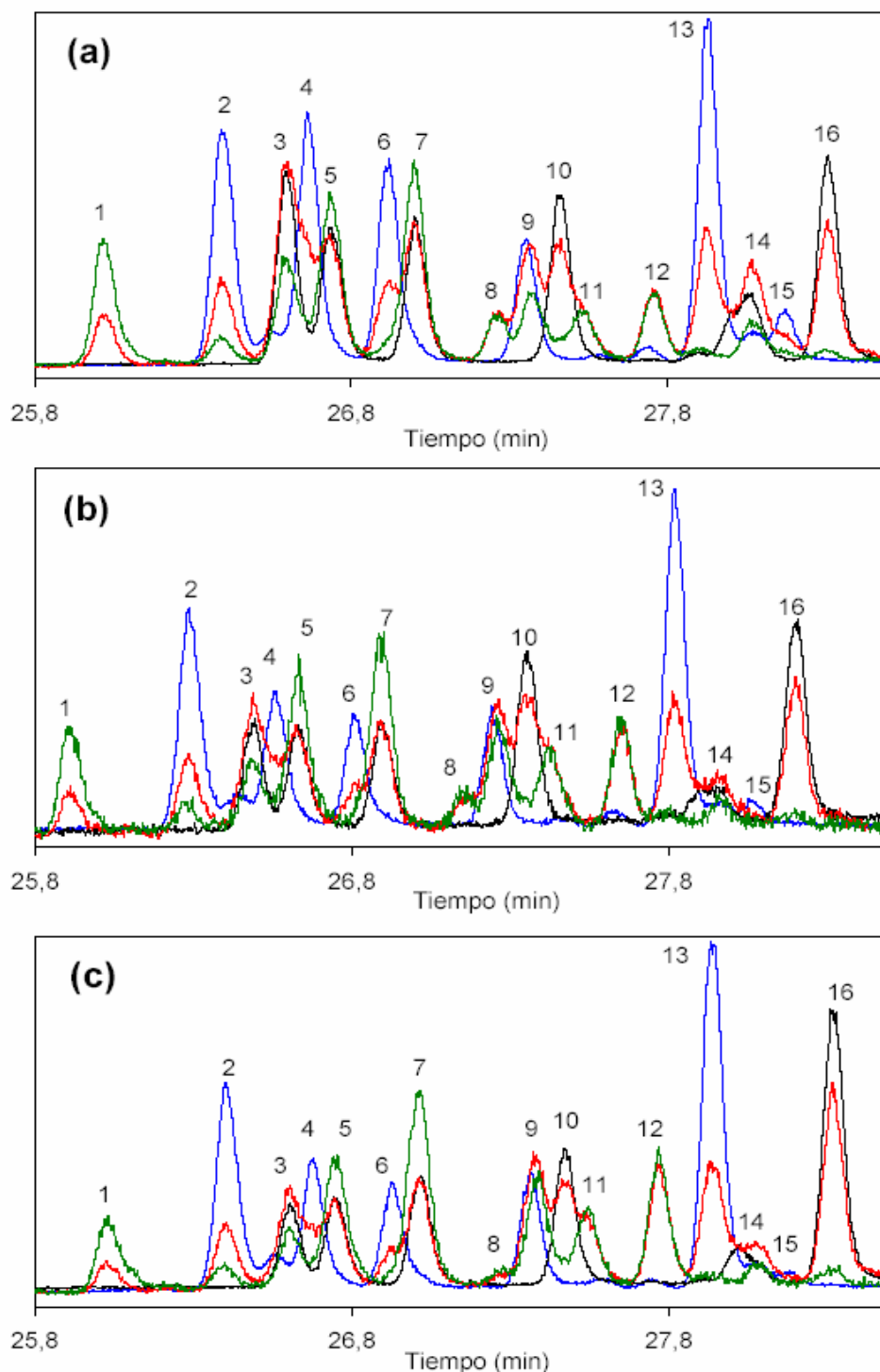
Sumado a la necesidad de alcanzar límites de detección muy bajos, uno de los principales problemas en la determinación de contaminantes orgánicos a nivel de vestigios es la potencial presencia de sustancias interferentes. Ahel y col. [Ahel *et al.*, 2000-*b*] presentaron una discusión profunda sobre el caso particular de la medición de NP $n$ EO y sus derivados lipofílicos en efluentes de plantas de tratamiento, utilizando HPLC en fase normal con detección de fluorescencia. Brevemente, los autores manifiestan que podría tratarse de una problemática específica de cada sitio de muestreo, por lo que aquellos puntos destinados a un análisis de rutina deberían ser examinados independientemente. Sin embargo, los investigadores citados hacen algunas consideraciones generales, que son tenidas en cuenta en el presente trabajo. Ellos sugieren que la interferencia de los usualmente concomitantes ésteres ftálicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos es superada principalmente a través del uso de la detección de fluorescencia a las longitudes de onda seleccionadas. De esta forma, los compuestos de mayor importancia potencialmente interferentes con la determinación de NP, NP1EO y NP2EO que restarían son otros alquilfenoles, los cuales pueden tener respuestas de fluorescencia significativas para las mismas longitudes de onda que los analitos de interés. Por eso, un adecuado pre-tratamiento de las muestras y una buena separación cromatográfica constituyen pasos clave.

Durante nuestro trabajo, no hemos hecho un estudio sobre compuestos interferentes remanentes en las muestras luego del proceso de enriquecimiento por extracción en fase sólida desarrollado. En cambio, hemos sometido a los picos de HPLC atribuidos a los analitos (a partir de inyecciones como las de las Figura 8) a un análisis posterior por GC-MS. Los cromatogramas de GC-MS

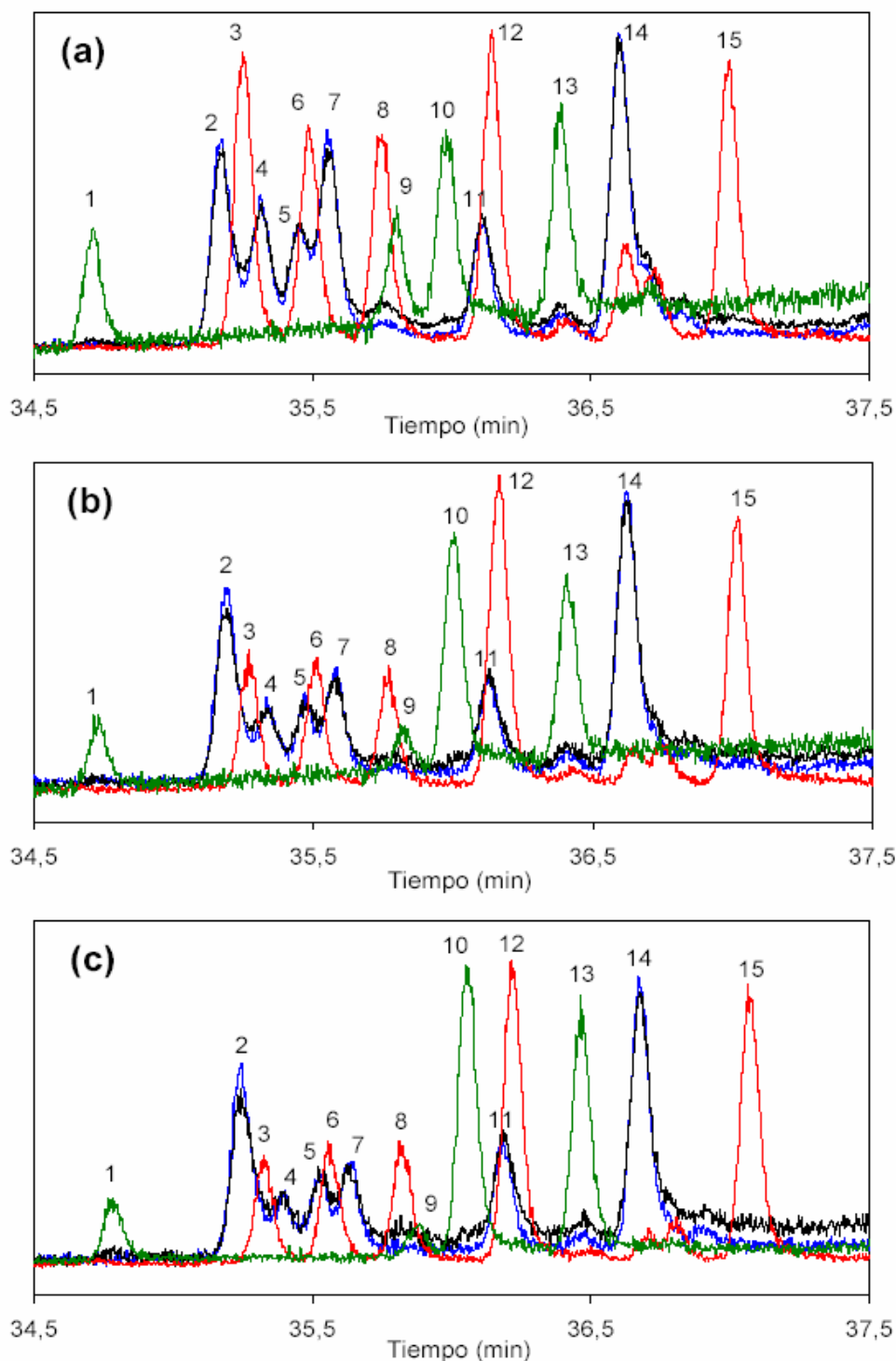
correspondientes a las fracciones colectados de HPLC se muestran en las Figuras 9, 10 y 11, junto con corridas de soluciones estándar de los analitos. En las figuras pueden reconocerse, para las fracciones colectadas de las muestras, los patrones de picos isoméricos que constituyen la huella digital de cada uno de los analitos. Además, los cálculos de cuantificación arrojaron porcentajes de pureza mayores que el 80% en todos los casos.

En suma, la claridad de los cromatogramas de HPLC junto con la alta pureza y la identificación inequívoca logradas a partir del análisis por GC-MS, sugieren que el procedimiento analítico propuesto (SPE sobre C-18 + elución con EtAc / HPLC en fase normal + detección de fluorescencia) ofrece un grado de selectividad apropiado para un monitoreo relativamente simple de los metabolitos persistentes NP, NP1EO y NP2EO en aguas tratadas y naturales.

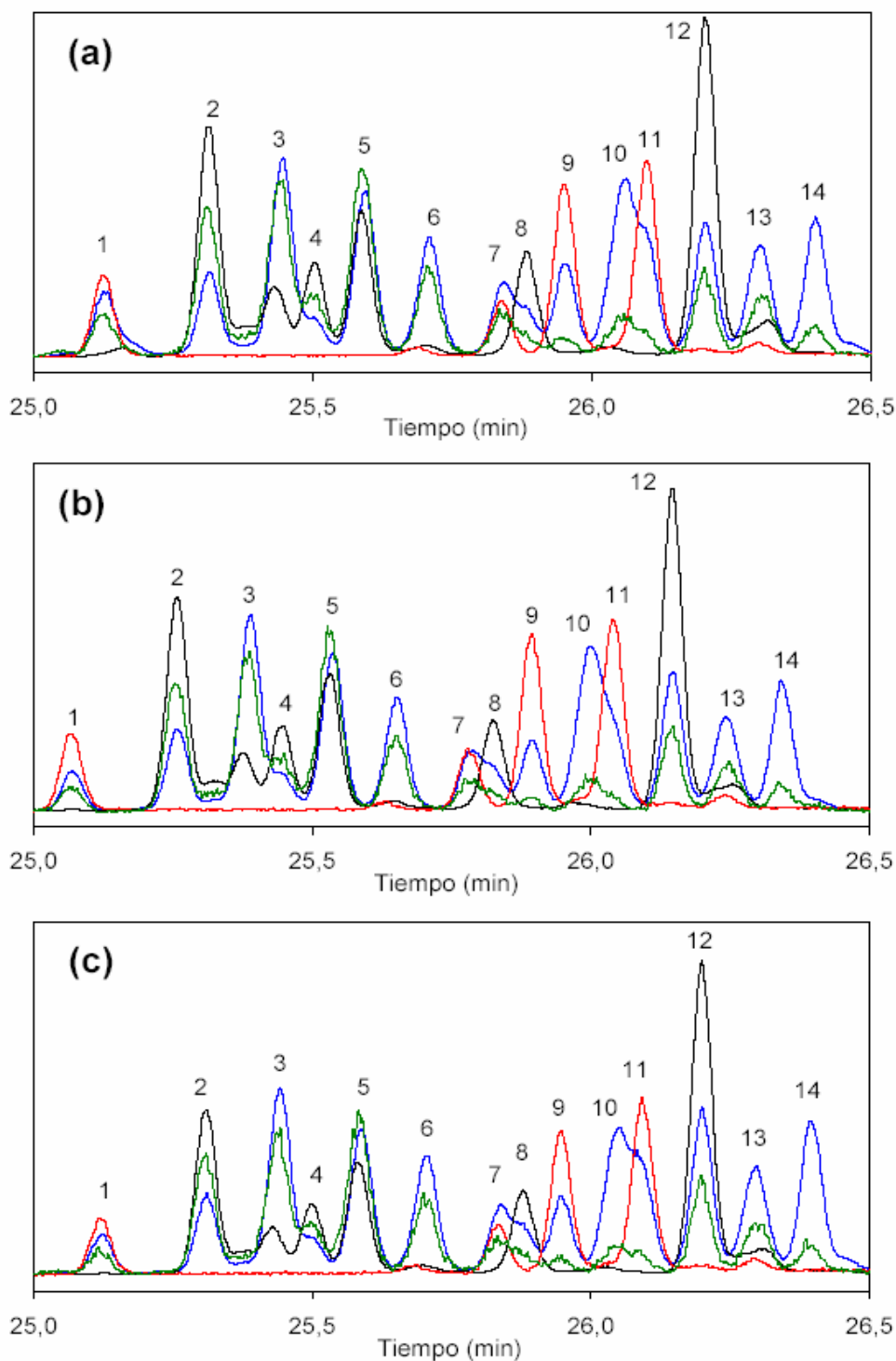
Finalmente, vale la pena mencionar ciertas diferencias notadas en la proporción de isómeros cuando se comparan las muestras con los materiales estándar utilizados (ver Figuras 9, 10 y 11). Las intensidades relativas están cambiadas dentro de los grupos de picos 3-5 y 8-11 en el caso del NP1EO, dentro del grupo de picos 2-10 en el caso del NP2EO y en un grado menor, dentro del grupo de picos 2-5 en el caso del NP. Las diferencias observadas podrían atribuirse a variaciones en la composición de las materias primas empleadas en la síntesis de los NP<sub>n</sub>EO que dieron origen a los productos de degradación encontrados, pero también podrían estar relacionadas con distintos grados de resistencia a la bio-degradación entre los distintos isómeros. Por supuesto, la información colectada no es suficiente para poder identificar el origen de las diferencias encontradas; aún así, estas observaciones pueden resultar relevantes, ya que ciertos investigadores han puesto últimamente un gran énfasis en la importancia que un punto de vista isómero-específico tendría a la hora de evaluar los efectos biológicos y ambientales del NP y los etoxilatos, dado que el potencial estrogénico puede variar entre las diferentes formas isoméricas, así como lo harían los procesos de degradación [Gabriel *et al.*, 2005; Günther *et al.*, 2006].



**Figura 9:** Cromatogramas SIM correspondientes a NP1EO. (a) Inyección directa de una solución estándar de NP1EO 15 mg/l, (b) fracción de HPLC correspondiente a NP1EO en la muestra del arroyo Morón y (c) fracción de HPLC correspondiente a NP1EO en la muestra del sedimentador secundario. Los números sobre los picos señalan los isómeros separados, y se correlacionan con los de la Tabla 2. Los colores de las líneas para las diferentes trazas iónicas monitoreadas son:  $m/z$  179 (azul),  $m/z$  193 (negro),  $m/z$  107 (rojo) y  $m/z$  165 (verde).



**Figura 10:** Cromatogramas SIM correspondientes a NP2EO. (a) Inyección directa de una solución estándar de NP2EO 10 mg/l, (b) fracción de HPLC correspondiente a NP2EO en la muestra del arroyo Morón y (c) fracción de HPLC correspondiente a NP2EO en la muestra del sedimentador secundario. Los números sobre los picos señalan los isómeros separados, y se correlacionan con los de la Tabla 2. Los colores de las líneas para las diferentes trazas iónicas monitoreadas son:  $m/z$  223 (azul),  $m/z$  135 (negro),  $m/z$  237 (rojo) y  $m/z$  251 (verde).



**Figura 11:** Cromatogramas SIM correspondientes a NP. (a) Inyección directa de una solución estándar de NP 20 mg/l, (b) fracción de HPLC correspondiente a NP en la muestra del arroyo Morón y (c) fracción de HPLC correspondiente a NP en la muestra del sedimentador secundario. Los números sobre los picos señalan los isómeros separados, y se correlacionan con los de la Tabla 2. Los colores de las líneas para las diferentes trazas iónicas monitoreadas son:  $m/z$  107 (azul),  $m/z$  135 (negro),  $m/z$  163 (rojo) y  $m/z$  220 (verde).

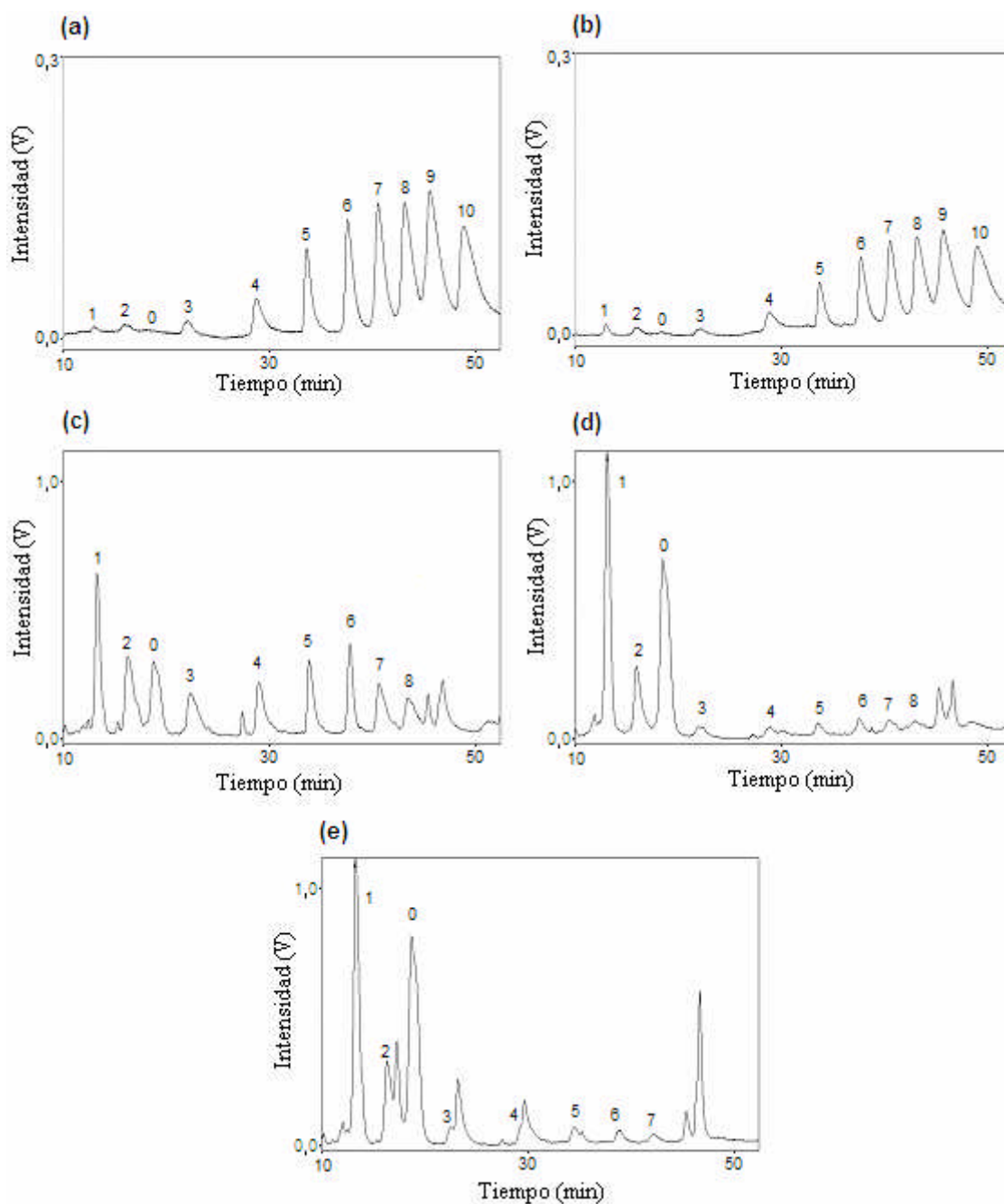
### 3.4.2. A LO LARGO DEL TRATAMIENTO (*SEGUNDO MUESTREO*)

Sobre la base de los alentadores resultados obtenidos en el primer muestreo con respecto a los métodos de pre-tratamiento y análisis propuestos, se decidió evaluar la metodología desarrollada en su aplicación para el seguimiento del proceso de degradación de los NP $n$ EO en el interior de la planta de tratamiento de efluentes domésticos.

Dentro de la familia de los poli-etoxilatos de nonilfenol, los tensioactivos más comúnmente utilizados son aquéllos cuyas cadenas contienen entre 5 y 20 unidades de óxido de etileno [Giger *et al.*, 1981]. Y entre ellos, el producto comercial más popular es aquél que contiene un promedio de 10 unidades etoxilo (es decir, el NP10EO) [Ahel *et al.*, 1994-*a*; Zoller, 2006]. Por tal motivo, ese fue el producto que se asumió como componente de partida mayoritario en esta parte del trabajo.

En la Figura 12 se reúnen los cromatogramas resultantes de la inyección en HPLC de la muestra de la cámara de partición, el efluente compuesto de los tanques Imhoff y el sobrenadante del lecho percolador (todas con un factor de concentración igual a 100); se incluyeron además cromatogramas de soluciones sintéticas de NP10EO, inyectadas tanto de forma directa como luego del proceso de extracción en fase sólida.

Los perfiles de oligómeros recuperados luego de la percolación de soluciones sintéticas de NP10EO fueron, para los dos niveles de concentración analizados, similares a los patrones de picos observados por inyección directa de soluciones estándar del producto (Figura 12-a y -b). La recuperación, calculada a partir de la suma de áreas de los etoxímeros separados (para  $n$  de 0 a 10), resultó de alrededor del 75% para ambos niveles de concentración. Puede observarse en algunos casos que los picos de los analitos en las muestras se solapan parcialmente con ciertos picos no identificados, pero aún así los cromatogramas ofrecen un grado de resolución suficiente como para identificar los compuestos de interés en forma confiable, mediante la adición de pequeñas cantidades de los estándares.



**Figura 12:** Cromatogramas de HPLC de: (a) inyección directa de una solución estándar de NP10EO 10 mg/l; (b) solución estándar de NP10EO 10 mg/l luego de la extracción en fase sólida ( $f_c = 1$ ); (c) muestra de la cámara de partición ( $f_c = 100$ ); (d) efluente compuesto de los tanques Imhoff ( $f_c = 100$ ); y (e) sobrenadante del lecho percolador ( $f_c = 100$ ). Los números indican el grado de etoxilación ( $n$ ) del oligómero de NP $n$ EO correspondiente a cada pico. Programa de composición y caudal de fase móvil: tal como se detalla en *Procedimientos, Sección 2.3.3*. Longitudes de onda de detección: 230 nm (excitación) y 300 nm (emisión); temperatura de la columna: 35 °C.



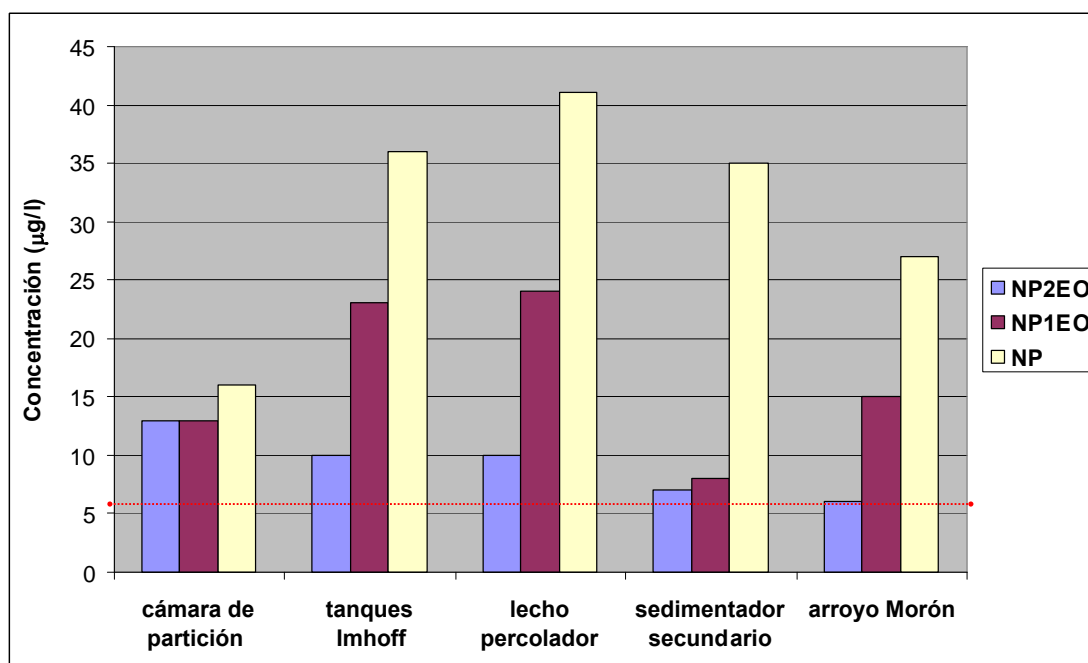
Las mezclas de NP, NP1EO y NP2EO no son utilizadas con frecuencia en formulaciones de detergentes debido a su escasa solubilidad en agua. Por ello, la presencia de cantidades importantes de estos compuestos en las muestras seleccionadas sólo podría ser explicada por su aparición -y eventual acumulación- a través de los procesos que contribuyen a la desaparición de los oligómeros superiores de partida [Giger *et al.*, 1981], y este hecho se hace evidente en las tres muestras colectadas.

Asumiendo que el material del cual se parte es principalmente NP10EO, la degradación del detergente puede apreciarse ya en el efluente primario. Los resultados para la muestra de la cámara de partición (Figura 12-c) sugieren que los etoxímeros de cadena larga ( $n > 7$ ) han sufrido una rápida degradación primaria, resultando en un aumento transitorio de la cantidad de moléculas de longitud de cadena media ( $3 < n < 6$ ). La muestra también contiene proporciones sustancialmente mayores de los etoxímeros inferiores ( $0 < n < 2$ ) que el producto original, hecho que había sido observado con anterioridad en afluentes crudos [Thiele *et al.*, 1997]; sin embargo, en nuestro caso hay que tener en cuenta que existen flujos de re-circulación (provenientes de pasos posteriores del tratamiento, ver Figura 1) que podrían contribuir con cantidades importantes de estos metabolitos recalcitrantes. Las concentraciones medidas en el extracto concentrado de la cámara de partición corresponden a niveles de 13 µg/l de NP1EO y NP2EO, y 16 µg/l de NP en la muestra acuosa.

Luego de la digestión anaeróbica en los tanques Imhoff, los etoxímeros con  $n > 3$  han desaparecido casi por completo, en favor de sus productos metabólicos persistentes NP2EO, NP1EO y NP (ver Figura 12-d). Las cantidades detectadas en este caso corresponden a concentraciones de 23 µg/l para NP1EO, 10 µg/l para NP2EO y 36 µg/l para NP en la muestra. Durante el proceso subsiguiente en el lecho percolador, el perfil de oligómeros no cambió en forma significativa (ver Figura 12-e), y las cantidades de los metabolitos estrogénicos acumulados resultaron de 24, 10 y 41 µg/l para NP1EO, NP2EO y NP, respectivamente. Los hechos observados en esta planta de tratamiento a gran escala están de acuerdo con los encontrados en los estudios a escala de laboratorio descritos en los capítulos precedentes: los etoxilatos de cadena larga desaparecen muy rápidamente, a la vez que crecen y se estabilizan las cantidades de los metabolitos NP2EO, NP1EO y NP.

En el siguiente gráfico (Figura 13), se reúnen los resultados cuantitativos de los dos muestreos. Esta claro que no sería correcto establecer una correlación directa entre los valores correspondientes a los procesos en el interior de la planta (segundo muestreo) con los del sedimentador secundario y el arroyo (primer muestreo), ya que las muestras fueron tomadas con varios meses de diferencia; sin embargo, parecería ser indiscutible la preponderancia que, seguido por el metabolito mono-

etoxilado, va adquiriendo el compuesto completamente desetoxilado (el nonilfenol) a lo largo del camino del efluente.



**Figura 13:** Resultados cuantitativos de los dos muestreos. Las muestras de la cámara de partición, los tanques Imhoff y el lecho percolador corresponden al segundo muestreo (invierno de 2006); las del sedimentador secundario y el arroyo Morón corresponden al primer muestreo (primavera de 2005). La línea roja punteada marca el nivel guía canadiense de equivalentes de nonilfenol para la protección de la vida acuática.

#### 4. CONCLUSIONES

En esta parte del trabajo, se propuso una metodología para la determinación de nonilfenol y nonilfenol mono- y di-etoxilado en muestras acuosas ambientales. El enriquecimiento de los analitos se llevó a cabo por extracción en fase sólida sobre un sorbente de C-18 y elución con acetato de etilo. Para la separación y cuantificación de las moléculas de interés se empleó HPLC en fase normal sobre una columna de amino-sílice y detección de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 200 y 300 nm, respectivamente. La aplicabilidad de dicha metodología

se estudió en el caso real de una planta de tratamiento de aguas de desecho del Gran Buenos Aires y el arroyo donde vuelca el efluente tratado. Si bien el interés se centró en la cuantificación de los metabolitos estrogénicos, también se analizó cualitativamente la evolución del perfil de oligómeros componentes del NP10EO a lo largo de diferentes estadios del tratamiento.

Con el método de HPLC/fluorescencia desarrollado, las desviaciones estándar relativas fueron menores que 7% para las áreas de pico y que 1% para los tiempos de retención de los tres analitos. Los límites de detección alcanzados resultaron de 0,8 µg/l para 4-NP1EO y 4-NP2EO, y 1,3 µg/l para *t*-NP, para un volumen de inyección de 50 µl (unas 20-25 veces menores que los obtenidos con detección por absorción a 277 nm para NP1EO y NP2EO, y unas 10 veces inferiores en el caso del NP). Así, los límites de detección del método completo, calculados para un tamaño de muestra de 100 ml, un factor de enriquecimiento de 100 y una recuperación promedio de 80%, fueron de aproximadamente 0,013 µg/l para cada uno de los compuestos. Teniendo en cuenta que sería factible obtener factores de enriquecimiento 10-50 veces mayores que los de este trabajo, puede decirse que los límites instrumentales obtenidos alcanzan holgadamente los requerimientos para el análisis de aguas moderadamente contaminadas y son apropiados incluso para el análisis de aguas con grados de contaminación leves, así como para la cobertura de los límites establecidos en diversos países para la protección del ambiente acuático.

La repetibilidad del método luego del enriquecimiento fue también muy buena, con valores de desviaciones estándar relativas que no superaron el 10% para las concentraciones de los tres metabolitos tanto en la muestra del sedimentador secundario como en la del arroyo. El método de extracción demostró ser robusto, ya que no se observaron variaciones en los valores de concentración resultantes ni en la apariencia de los cromatogramas al cambiar el tamaño ni el pH de la muestra, la masa de fase sólida, el volumen de solvente de elución y la composición del solvente de re-disolución del extracto seco. Tanto la acidificación de la muestra como la re-disolución del extracto en el solvente de elución de HPLC contribuyeron a la obtención de soluciones más límpidas, por lo que finalmente se incluyó en el procedimiento el ajuste de la muestra a pH 3 previo a la extracción, y la re-disolución del extracto seco en 4,1% 2-PrOH en *hexanos*. Los porcentajes de recuperación de las muestras resultaron 85% para NP1EO y NP2EO, y 74% para NP (arroyo Morón) y 91% para NP1EO, 85% para NP2EO y 73% para NP (efluente tratado). Estos valores se consideraron apropiados con fines de cuantificación, y están de acuerdo con los reportados por otros investigadores para la determinación de este tipo de compuestos. La recuperación más pobre del NP comparada con las de sus homólogos etoxilados NP1EO y NP2EO, podría ser explicada por

el mayor grado de lipofilidad de dicho analito, por lo que quedaría más fuertemente retenido sobre la fase sólida de C-18 y no sería tan eficientemente eluido por el EtAc.

A fin de confirmar la identidad de los picos atribuidos a los analitos en los cromatogramas de HPLC de las muestras del sedimentador secundario y del arroyo, se los sometió a un análisis posterior por GC-MS, utilizando el analizador en el modo de monitoreo de iones seleccionados. Se empleó una columna completamente no polar y se obtuvieron patrones característicos de isómeros de la cadena alquílica para cada uno de los tres metabolitos. En todos los casos, los métodos SIM permitieron distinguir al menos 14 picos isoméricos, dando lugar a huellas digitales características de cada analito, las cuales pudieron ser reconocidas inequívocamente en las fracciones colectadas de las muestras; además, la cuantificación arrojó porcentajes de pureza mayores que el 80% en todos los casos, lo que sumado a la buena resolución y forma de picos de los cromatogramas de HPLC, permite concluir que el procedimiento analítico propuesto ofrece un grado de selectividad apropiado para el monitoreo de NP, NP1EO y NP2EO en aguas naturales y tratadas.

Cabe resaltar que, si bien muchos autores han cuantificado los productos de degradación de los NP $n$ EO (en especial NP, el metabolito más asiduamente estudiado) directamente por GC-MS, parece ser más práctica la alternativa de cuantificarlos por HPLC y confirmar sus identidades (cuando sea considerado necesario, por ejemplo, en caso de pobre resolución en HPLC, de obtención de concentraciones inesperadamente elevadas, etc.) haciendo uso de las huellas digitales características y de la alta selectividad que ofrece la cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masas. Tal como pudo observarse durante este trabajo, la cuantificación por GC-MS presenta una complicación primordial, dada por la respuesta diferencial para los distintos isómeros de un mismo metabolito. Claramente, entre los picos observados hay isómeros irresueltos; prueba de ello es que, en el caso del NP, Giger y col. [Giger *et al.*, 1981] separaron 9 picos, Thiele y col. [Thiele *et al.*, 2004] separaron 18 y en este trabajo pudimos distinguir 14 con el método SIM, pero los picos numerados 3-b, 5-b y 13-b no fueron tenidos en cuenta para la cuantificación. Partiendo de la base de que algunos picos están compuestos por más de un isómero, resulta entonces complicado hacer una corrección rigurosa de los factores de respuesta de cada isómero en GC-MS. Más aún, debido a problemas de deriva en la línea de base y limitaciones en el sistema de integración en las mediciones realizadas por GC-FID para calcular la proporción de isómeros en los productos técnicos, algunos picos no pudieron ser integrados separadamente (tal como se manifiesta en la Tabla 2).

El método de análisis presentado para los metabolitos lipofílicos en aguas tratadas y naturales, fue probado también en las fases acuosas procedentes de estadios tempranos e intermedios del

tratamiento, dentro de la planta. Los perfiles de oligómeros recuperados luego de la percolación de soluciones sintéticas de NP10EO reprodujeron bien los patrones de picos observados por inyección directa de soluciones estándar del producto y la recuperación del tensioactivo resultó de alrededor del 75%. Además, los cromatogramas de las muestras ofrecieron grados de resolución suficientes como para identificar los compuestos de interés en forma confiable. Por tales razones, se encontró a la metodología propuesta apropiada también para este tipo de análisis. Asumiendo que el material preponderante en los efluentes domésticos es principalmente NP10EO, la degradación del detergente pudo apreciarse ya en el efluente primario. Los resultados para la muestra de la cámara de partición sugieren que los etoxímeros de cadena larga ( $n > 7$ ) sufren una rápida degradación, resultando en un aumento transitorio de la cantidad de moléculas de longitud de cadena media ( $3 < n < 6$ ). Luego de la digestión anaeróbica en los tanques Imhoff, los etoxímeros con  $n > 3$  desaparecieron casi por completo, en favor de sus productos metabólicos persistentes NP2EO, NP1EO y NP. Durante el proceso subsiguiente en el lecho percolador, el perfil de oligómeros no cambió en forma significativa.

Claramente, el sitio estudiado representa un único punto en el espacio. Sin embargo, fue seleccionado porque puede considerársele representativo de la dinámica de los compuestos investigados en sistemas de aguas de desecho de la zona del Gran Buenos Aires. De esta forma, se pudo demostrar la utilidad de la metodología analítica propuesta y, a la vez, obtener resultados relevantes desde el punto de vista del conocimiento sobre el destino y la incidencia de los NP $n$ EO.

Los hechos observados en esta planta de tratamiento a gran escala están de acuerdo con los encontrados en los estudios a escala de laboratorio descriptos en los capítulos precedentes: los etoxilatos de cadena larga desaparecen muy rápidamente, mientras crecen y se estabilizan las cantidades de los metabolitos NP2EO, NP1EO y NP; además, parecería clara la preponderancia que, seguido por el NP1EO, va adquiriendo el NP a lo largo del camino del efluente.

En cuanto al significado de los niveles encontrados para los metabolitos lipofílicos, bio-rrefractarios de los NP $n$ EO (en las decenas de  $\mu\text{g/l}$ ), se puede decir que se trata de valores similares a aquéllos reportados en otros países a lo largo de las últimas décadas, y que son consistentes con un uso generalizado de los tensioactivos. Son todos ecológicamente relevantes si se considera la posibilidad de bio-acumulación y, en el caso del nonilfenol, los niveles medidos se ubican en el extremo superior del intervalo de concentraciones reportadas en la literatura, con valores que están bien por encima del umbral de inducción de actividad estrogénica en una variedad de organismos acuáticos. Las concentraciones medidas en el efluente tratado y en el arroyo, que resultaron

comparables, superan ampliamente los valores límite o niveles guía para la protección de la vida acuática establecidos en países como Canadá y Holanda.

Estos resultados constituyen, a nuestro entender, un punto de partida hacia una evaluación rigurosa de la incidencia de los poli-etoxilatos de alquilfenol en la República Argentina, ya que hasta la fecha sólo se disponía de un número muy reducido de datos cualitativos o semi-cuantitativos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ahel M., Giger W., *Anal. Chem.* **57** 1577 (1985-a)
- Ahel M., Giger W., *Anal. Chem.* **57** 2584 (1985-b)
- Ahel M., Giger W., Koch M., *Water Res.* **28** 1131 (1994-a)
- Ahel M., Giger W., Molnar E., Ibric S., *Croat. Chem. Acta* **73** 209 (2000-b)
- Ahel M., Giger W., Schaffner C., *Water Res.* **28** 1143 (1994-b)
- Ahel M., Molnar E., Ibric S., Giger W., *Water Sci. Technol.* **42** 15 (2000-a)
- Ahel M., Schaffner C., Giger W., *Water Res.* **30** 37 (1996)
- Ahel M., Scully F.E., Hoigné J., Giger W., *Chemosphere* **28** 1361 (1994-c)
- Altria K. D., Chen A. B., Clohs L., *CE Currents en LCGC* **19** (9) (2001)
- Altria K.D., Clark B.J., Filbey S.D., Nelly M.A., Rudd D.R., *Electrophoresis* **16** 2143 (1995)
- APEREC - Regulatory status 2004, en [www.aperc.org](http://www.aperc.org) (2008)
- Babay P.A., Gettar R.T., Thiele B., en *Determination of lipophilic nonylphenol ethoxylate metabolites in environmental waters*, presentado en la IV Reunión SETAC LA, Buenos Aires, Argentina (2001)
- Balch G., Metcalfe C., *Chemosphere* **62** 1214 (2006)
- Beesley A.H., Evans D.F., Laughlin R.G., *J. Phys. Chem.* **92** 791 (1988)
- Berryman D., Houde F., DeBlois C., O'Shea M., *Chemosphere* **56** 247 (2004)
- Blackburn M.A., Waldock M.J., *Water Res.* **29** 1623 (1995)
- Blanco E., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R., *J. Chromatogr. A* **1071** 205 (2005)
- Bowser M.T., Kranack A.R., Chen D.D.Y., *Trends Anal. Chem.* **17** 424 (1998)
- Bullock J., *J. Chromatogr.* **645** 169 (1993)
- Canadian Environmental Protection Act 1999 - Priority Substances List Assessment Report: Nonylphenol and its Ethoxylates, Environment Canada (2001)
- Canadian Environmental Protection Act 1999 - Proposed Notice Requiring the Preparation and Implementation of Pollution Prevention Plans in Respect of Nonylphenol and its Ethoxylates Contained in Products, Environment Canada (2003)



- Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life - Nonylphenol and its Ethoxylates, Canadian Council of Ministers of the Environment (2001)
- Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Domínguez-Alvarez, J., Hernández-Méndez J., *J. Chromatogr. A* **869** 451 (2000)
- Castells C.B., Gagliardi L.G., Ràfols C., Rosés M., Bosch E., *J. Chromatogr. A* **1042** 23 (2004)
- Castillo M., Martínez E., Ginebreda A., Tirapu L., Barceló D., *Analyst* **125** 1733 (2000)
- Chang B.V., Yu C.H., Yuan S.Y., *Chemosphere* **55** 493 (2004)
- Cheng C-Y., Wu C-Y., Wang C-H., Ding W-H., *Chemosphere* **65** 2275 (2006)
- Cho D., S. Park, Hong J., Chang T., *J. Chromatogr. A* **986** 299 (2003)
- Cottet H., Struijk M.P., Van Dongen J.L.J., Claessens H.A., Cramers C.A., *J. Chromatogr. A* **915** 241 (2001)
- Desbène A.M., Geulin L., Morin C.J., Desbène P.L., *J. Chromatogr. A* **1068** 159 (2005)
- Di Corcia A., Cavallo R., Crescenzi C., Nazzari M., *Environ. Sci. Technol.* **34** 3914 (2000)
- Di Marzio W.D., Sáenz M., Alberdi J., Tortorelli M., Galassi S., *Ecotoxicol. Environ. Safety* **61** 380 (2005)
- Directiva 2003/53/CE
- Dolan J.W., Snyder L.R., Blanc T., *J. Chromatogr. A* **897** 51 (2000-b)
- Dolan J.W., Snyder L.R., Blanc T., Van Heukelem L., *J. Chromatogr. A* **897** 37 (2000-a)
- Ejlertsson J., Nilsson M.-L., Kylin H., Bergman Å., Karlson L., Oquist M., Svensson B.H., *Environ. Sci. Technol.* **33** 301 (1999)
- Ekelund R., Granmo Å., Magnusson K., Berggren M., Bergman Å., *Environ. Pollut.* **79** 59 (1993)
- Engelhardt H., en *High Performance Liquid Chromatography - Chemical Laboratory Practice*, Springer-Verlag (1979)
- EPA-822-R-05-005: Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria – Nonylphenol (2005)
- Esteban L., en *La espectrometría de masas en imágenes*, ACK Editores, Madrid, España (1993)
- Ferguson P.L., Brownawell B.J., *Environ. Toxicol. Chem.* **22** 1189 (2003)
- Ferguson P.L., Iden C.R., Brownawell B.J., *Anal. Chem.* **72** 4322 (2000)

- Fiedler S., Foerster M., Glaser B., Zech W., *Chemosphere* **66** 212 (2007)
- Field J.A., Reed R.L., *Environ. Sci. Technol.* **30** 3544 (1996)
- Foret F., Křivánková L., Boček P., en *Capillary Zone Electrophoresis*, Electrophoresis Library, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Alemania (1993)
- Fremmersvik G., Hansen N., en *Desk study: LAS and Nonylphenols – HORIZONTAL-13* (2004)
- Fries E., Püttmann W., *Atmos. Environ.* **38** 2013 (2004)
- Fries E., Püttmann W., *J. Environ. Monit.* **5** 598 (2003)
- Fritz J.S., *Electrophoresis* **24** 1530 (2003)
- Gabriel F.L.P., Giger W., Günther K., Kohler H.-P.E., *Appl. Environ. Microbiol.* **71** 1123 (2005)
- Gagliardi L.G., Castells C.B., Ràfols C., Rosés M., E. Bosch, *Anal. Chem.* **78** 5858 (2006)
- Gagliardi L.G., Castells C.B., Ràfols C., Rosés M., E. Bosch, *J. Chromatogr. A* **1077** 159 (2005)
- Geiser L., Mirgaldi M., Veuthey J.-L., *J. Chromatogr. A* **1068** 75 (2005)
- Gibson R., Becerril-Bravo E., Silva-Castro V., Jiménez B., *J. Chromatogr. A* **1169** 31 (2007)
- Giesy J. P., Pierens S.L., Snyder, E.M., Miles-Richardson S., Kramer V.J., Snyder S.A., Nichols K.M., Villeneuve D.A., *Environ. Toxicol. Chem.* **19** 1368 (2000)
- Giger W., Brunner P. H., Schaffner C., *Science* **225** 623 (1984)
- Giger W., Stephanou E., Schaffner C., *Chemosphere* **10** 1253 (1981)
- González S., Petrovic M., Barceló D., *J. Chromatogr. A* **1052** 111 (2004)
- Gray M.A., Metcalfe C.D. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16** 1086 (1997)
- Greibrokk T., Andersen T., *J. Chromatogr. A* **1000** 743 (2003)
- Gronen S., Denslow N., Manning S., Barnes S., Barnes D., Brouwer, M., *Environ. Health Perspect.* **107** 385 (1999)
- Grossman P.D., Colburn J.C. (Eds.), en *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, Estados Unidos (1992)
- Günther K., Dürbeck H.-W., Kleist E., Thiele B., Prast H., Schwuger M., *Fresen. J. Anal. Chem.* **371** 782 (2001)

- Günther K., Heinke V., Thiele B., Kleist E., Prast H., Räcker T., *Environ. Sci. Technol.* **36** 1676 (2002)
- Günther K., Kleist E., Thiele B., *Anal. Bioanal. Chem.* **384** 542 (2006)
- Gutmann V., *Electrochim. Acta* **21** 661 (1976)
- Harris C.A., Santos E.M., Janbakhsh A., Pottinger T.G., Tyler C.R., Sumpter J.P., *Environ. Sci. Technol.* **35** 2909 (2001)
- Hatsis P., Lucy C.A., *J. Chromatogr. A* **920** 3 (2001)
- Hayashi S., Saito S., Kim J-H., Nishimura O., Sudo R., *Environ. Sci. Technol.* **39** 5626 (2005)
- He Y., Lee H.K., *J. Chromatogr. A* **749** 227 (1996)
- Heiger, D.N., en *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*, Hewlett-Packard Company, Alemania (1992)
- Heinig K., Vogt C., *Electrophoresis* **20** 3311 (1999)
- Heinig K., Vogt C., Werner G., *Fresenius J. Anal. Chem.* **357** 695 (1997)
- Instituto Nacional de Ecología de México - Listado adicional al Convenio de Estocolmo: Sustancias de uso industrial (2004)
- International Sorbent Technology (IST), en *A guide to solid phase extraction* (2004)
- ISO:9888: Water Quality - Evaluation of Ultimate Aerobic Biodegradability of Organic Compounds in Aqueous Medium - Static Test (Zahn-Wellens Method), Génova, Suiza (1999)
- Jandera P., *Chromatographia* **26** 417 (1988)
- Jandera P., Holčápek M., Theodoridis G., *J. Chromatogr. A* **813** 299 (1998)
- Jandera P., Urbánek J., Prokeš B., Churáček J., *J. Chromatogr.* **504** 297 (1990)
- Jimenez-Gonzalez A., Siles-Alvarado S., Monroy O., *Water Sci. Technol.* **48** 165 (2003)
- Jin X., Jiang G., Huang G., Liu J., Zhou Q., *Chemosphere* **56** 1113 (2004)
- Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P., Sumpter J., *Environ. Toxicol. Chem.* **15** 194 (1996)
- John D.M., White G.F., *J. Bacteriol.* **180** 4332 (1998)
- Johnson A.C., Sumpter J.P., *Environ. Sci. Technol.* **35** 4697 (2001)

- Kamiyusuki T., Monde T., Nemoto F., Konakahara T., Takahashi Y., *J. Chromatogr. A* **852** 475 (1999)
- Kang I.J., Yokota H., Oshima Y., Tsuruda, Y. Hano, T. Maeda, M. Imada, N. Tadokoro H., Honjo T., *Environ. Toxicol. Chem.* **22** 2438 (2003)
- Kinnberg K., Korsgaard B., Bjerregaard P., *Comp. Biochem. Physiol.* **134** 45 (2003)
- Kinnberg K., Korsgaard B., Bjerregaard P., Jespersen A., *J. Exp. Biol.* **203** 171 (2000)
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T., *Environ. Sci. Technol.* **36** 1202 (2002)
- La Farré M., García M.-J., Castillo M., Riu J., Barceló D., *J. Environ. Monit.* **3** 232 (2001)
- La Voz del Interior: Se adelanta un cambio en los adyuvantes de agroquímicos (2005)
- Lara-Martín P.A., Gómez-Parra A., E. González-Mazo, *J. Chromatogr. A* 1137 188 (2006)
- Lewis S.K., Lech J.J., *Xenobiotica* **26** 813 (1996)
- Li X.-F., Ma M., Cheng A., Zheng J., Tam Y., *Anal. Chim. Acta* **457** 165 (2002)
- Lide D.R. (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 79<sup>th</sup> edition, Boca Raton, FL (1998-1999)
- Loos R., Hanke G., Eisenreich S.J., *J. Environ. Monit.* **5** 384 (2003)
- Luppi L.I., en *Degradación de nonil fenol polietoxilado en reactores biológicos a escala de laboratorio en presencia de distintos aceptores de electrones*, Tesis presentada para optar al título de Magíster en Ingeniería Ambiental, UTN, Argentina (2005)
- Maguire R.J., *Water Qual. Res. J. Can.* **34** 37 (1999)
- Manzano M.A., Perales J.A., Sales D., Quiroga J.M., *Water Res.* **33** 2593 (1999)
- Marcomini A., Capri S., Giger W., *J. Chromatogr.* **403** 243 (1987)
- Marcomini A., Di Corcia A., Samperi R., Capri S., *J. Chromatogr.* **644** 59 (1993)
- Martínez D., Cugat M.J., Borrull F., Calull M., *J. Chromatogr. A* **902** 65 (2000)
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., Jong S. De, Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J., en *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Holanda (1997)
- Massart F., Harrell J.C., G. Federico, G. Saggese, *J. Perinatol.* **25** 282 (2005)

Mayer T., Bennie D., Rodsa F., Rekas G., Palabrica V., Schachtschneider J., *Environ. Pollut.* **147** 683 (2007)

Menzinger F., Schmitt-Kopplin Ph., Freitag D., Kettrup A., *J. Chromatogr. A* **891** 45 (2000)

Metcalfe C.D., Metcalfe T.L., Kiparissis Y., Koenig B.G., Khan C., Hughes R.J., Croley T.R., March R.E., Potter T., *Environ. Toxicol. Chem.* **20** 297 (2001)

Meyers R.H., Montgomery D.C., en *Response surface methodology, process and product optimization*, John Wiley & Sons Inc., Estados Unidos (1995)

Mikaeli S., Thorsén G., Karlberg B., *J. Chromatogr. A* **907** 267 (2001)

Millipore: Tabla de compatibilidad química de los productos, Catálogo de Laboratorio Millipore (2000-2001)

Misra P.K., Mishra B.K., Behera G.B., *Colloid Surface* **57** 1 (1991)

Moeder M., Martin C., Harynuk J., Górecki T., Vinken R., Corvini P.F.X., *Journal of Chromatography A* **1102** 245 (2006)

Mohan P.K., Nakhla G., Yanful E.K., *Water Res.* **40** 533 (2006)

Morales S., Cela R., *J. Chromatogr. A* **846** 401 (1999)

Morales S., Cela R., *J. Chromatogr. A* **896** 95 (2000)

Moyá M.L., Rodríguez A., Graciani M.M., Fernández G., *J. Colloid Interface Sci.* **316** 787 (2007)

Mundo Químico - El Newsletter del Sector Químico Argentino, N° 45 (2006)

Okada T., *Analyst* **118** 959 (1993)

Okada T., *J. Chromatogr. A* **695** 309 (1995)

Okada T., *J. Chromatogr. A* **771** 275 (1997)

Okada T., *J. Chromatogr. A* **804** 17 (1998)

Okada T., *Macromolecules* **23** 4216 (1990)

Oudhoff K.A., Schoenmakers P.J., Kok W.Th., *J. Chromatogr. A* **985** 479 (2003)

Peters R.J.B, Beeltjeb H., van Delftb R.J., *J. Environ. Monit.* **6** 760 (2008)

Petrovic, M., Fernández-Alba, A.R., Borrull, F., Marce, R.M., Mazo, E.G., Barceló, D., *Environ. Toxicol. Chem.* **21** 37 (2002)

- Plackett R.L., Burman J.P., *Biometrika* **23** 305 (1946)
- Poder Legislativo de la Provincia de Córdoba, Comisión de Agricultura, Ganadería y Recursos Renovables de la Legislatura Provincial: Abordan iniciativas referidas a la ley de agroquímicos (2006)
- Pojana G., Gomiero A., Jonkers N., Marcomini A., *Environ. Int.* **33** 929 (2007)
- Porras S.P., Kenndler E., *J. Chromatogr. A* **1037** 455 (2004)
- Porras S.P., Kuldvee, R. Palonen S., Riekkola M.-L., *J. Chromatogr. A* **990** 35 (2003)
- Potter T.L., Simmons K., Wu J.N., Sanchez-Olvera M., Kostecki P., Calabrese E., *Environ. Sci. Technol.* **33** 113 (1999)
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente - Productos Químicos - Evaluación Regional sobre Sustancias Tóxicas Persistentes, Informe Regional de América Central y El Caribe (2002)
- Quesada-Molina C., García-Campaña A.M., del Olmo-Iruela L, del Olmo M., *J. Chromatogr. A* **1164** 320 (2007)
- Regan F., Moran A., Fogarty B., Dempsey E., *J. Chromatogr. A* **1014** (2003) 141
- Reinhard M., Goodman N., *Environ. Sci. Technol.* **16** 351 (1982)
- Rey M.A., Pohl C.A., *J. Chromatogr. A* **739** 87 (1996)
- Richardson S.D., *Anal. Chem.* **75** 2831 (2003)
- Riekkola M.-L., Jussila M., Porras S.P., Valkó I.E., *J. Chromatogr. A* **892** 155 (2000)
- Rissler K., *J. Chromatogr. A* **742** 1 (1996)
- Rogan M.M., Altria K.D., Goodall D.M., *Chromatographia* **38** 723 (1994)
- Rosen M.J., en *Surfactants and Interfacial Phenomena* (Segunda Edición), Wiley-Interscience, Estados Unidos (1989)
- Salanitro J.P., Diaz L.A., *Chemosphere* **30** 813 (1995)
- Salimi-Moosavi H., Cassidy R.M., *Anal. Chem.* **67** 1067 (1995)
- Salimi-Moosavi H., Cassidy R.M., *Anal. Chem.* **68** 293 (1996)
- Schwarzenbach R.P., Escher B.I., Fenner K., Hofstetter T.B., Johnson C.A., von Gunten U., Wehrli B., *Science* **313** 1072 (2006)

Schwer C., Kenndler E., *Anal. Chem.* **63** 1801 (1991)

Scott M.J., Jones M.N., *Biochim. Biophys. Acta* **1508** 235 (2000)

Seifar R.M., Kraak J.C., Kok W.Th., *Anal. Chem.* **69** 2772 (1997)

Shi Y., Fritz J.S., *Anal. Chem.* **67** 3023 (1995)

Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A., *Environ. Sci. Technol.* **36** 1751 (2002)

Simpson N.J.K. (Editor), en *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications*, Marcel Dekker, NuevaYork, Estados Unidos (2000)

Smith E., Ridgway I., Coffey M., *J. Environ. Monit.* **3** 616 (2001)

Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P., *Environ. Sci. Technol.* **33** 2814 (1999)

Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N., *Environ. Int.* **34** 1033 (2008)

Soto A.M., Justicia H., Wray J.W., Sonnenschein C., *Environ. Health Persp.* **92** 167 (1991)

Stephanou E., Giger W., *Environ. Sci. Technol.* **16** 800 (1982)

Summary of the Interim Report – Nonylphenol, National Institute of Technology and Evaluation of Japan, Study Group for Risk Assessment & Management of Nonylphenol (2003), en [www.safe.nite.go.jp](http://www.safe.nite.go.jp)

Sumpter J.P., Johnson A.C., *Environ. Sci. Technol.* **39** 4321 (2005)

Sun S.W., Lin Y.R., *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **24** 2051 (2001)

Swartz C.H., Reddy S., Benotti M.J., Yin H., Barber L.B., Brownawell B.J., Rudel R.A., *Environ. Sci. Technol.* **40** 4894 (2006)

Swedish Chemicals Agency - Supervisory Authority under the Ministry of the Environment, en [www.kemi.se](http://www.kemi.se) (2008)

Takeda S., Iida S., Chayama K., Tsuji H., Fukushi K., Wakida S., *J. Chromatogr. A* **895** 213 (2000)

Takeda S., Omura A., Chayama K., Tsuji H., Fukushi K., Yamane M., Wakida S., Tsubota S., Terabe S., *J. Chromatogr. A* **1014** 103 (2003)

Terabe S., en *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Beckman Instruments, Estados Unidos (1992)

- Thiele B., Günther K., Schwuger M. J., *Chem. Rev.* **97** 3247 (1997)
- Thiele B., Heinke V., Kleist E., Günther K., *Environ. Sci. Technol.* **38** 3405 (2004)
- Thomson B.M., Cressey P.J., Shaw I.C., *J. Environ. Monit.* **5** 229 (2003)
- Thurman E.M., Mills M.S., en *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, Wiley-Interscience, Estados Unidos (1998)
- Topp E., Starratt A., *Environ. Toxicol. Chem.* **19** 313 (2000)
- USEPA en *Capillary Electrophoresis for Environmental Monitoring*, Las Vegas, Estados Unidos (1999)
- Van den Belt K., Verheyen R., Witters H., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41** 458 (2001)
- Van Vlaardingen P.L.A., Posthumus R., Traas T.P., en *RIVM report 601501019/2003: Environmental Risk Limits for Alkylphenols and Alkylphenol ethoxylates*, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Holanda (2003)
- Vanhoenacker G., Sandra P., *J. Chromatogr. A* **1082** 193 (2005)
- Vethaak A.D., Lahr J., Schrap S.M., Belfroid A.C., Rijs G.B.J., Gerritsen A., de Boer J., Bulder A.S., Grinwis G.C.M., Kuiper R.V., Legler J., Murk T.A.J., Peijnenburg W., Verhaar H.J.M., de Voogt P., *Chemosphere* **59** 511 (2005)
- Vindevogel J., Sandra P., *Anal. Chem.* **63** 1530 (1991)
- Vitali M., Ensabella F., Stella D., Guidotti M., *Chemosphere* **57** 1637 (2004)
- Walbroehl, Y., Jorgenson, J.W., *Anal. Chem.* **58** (1986) 479
- Wheeler T.F., Heim J.R., LaTorre M.R, Janes A.B., *J. Chromatogr. Sci.* **35** 19 (1997)
- White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G., *Endocrinology* **135** 175 (1994)
- Wu C.F. J., Hamada M., en *Experiments: Planning, Analysis, and Parameter Design Optimization*, Wiley Series in Probability and Statistics, John Wiley & Sons Inc., Estados Unidos (2000)
- Ying G-G., *Environ. Int.* **32** 417 (2006)
- Ying G-G., Williams B., Kookana R., *Environ. Int.* **28** 215 (2002)
- Zoller U., *Environ. Int.* **32** 269 (2006)