

Dainis Norai Vera Arreaza

**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE UN GRUPO DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS A LO LARGO DE TODO EL RECORRIDO DEL RÍO
FRANCOLÍ**

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

dirigido por el Dr. Francesc Borrull Ballarin

Grado de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2016

INDICE

	Página
1-. Resumen	1
2-. Objetivos	2
3-. Antecedentes	2
4-.Introducción	3
5-.Fundamentos	
5.1-. Espectroscopia de masas	5
5.1.1-. Instrumentación	6
5.1.1.1-. Sistema de introducción de muestras	6
5.1.1.2-. Fuente de ionización	6
5.1.1.3-. Analizadores de masas	8
5.1.1.4-. Detectores	8
5.2-. Espectroscopia de masas en tándem (MS/MS)	9
6-.Parte experimental	
6.1-. Reactivos y materiales	11
6.2-. Soluciones intermedias y patrones	12
6.3-. Muestreo	13
6.4-. Extracción en fase sólida (SPE)	19
6.5-. LC-(ESI), MS/MS	20
6.6-. Cuantificación	21
6.7-. Estudio económico	21
7-. Resultados y discusión	
7.1-. Caracterización fisicoquímica del agua	23
7.2-. Parámetros de validación de método analítico	25
7.3-. Cuantificación de los analitos	27
8.- Conclusiones	28
9-. Referencias	29
10-. Anexos	31

1. RESUMEN

Quality parameters were studied, pH, temperature and conductivity, in situ at different points around the route of the Francolí river, from its source in l'Espluga de Francolí to its mouth in the port of Tarragona, the results show that the river it can be classified within the boundaries of good/moderate IPH. These values are related to human activities near the river, especially industrial activities.

Moreover, they were determined simultaneously a group of five derivatives benzotriazole (BTR), four benzothiazole (BTS) and five benzenesulfonamide (BSA); compounds of high production and wide range of applications in various industrial processes and household products, along with high water solubility and resistance to biodegradation, based on previous studies. The method consisted of a solid phase extraction (SPE) with Oasis HLB followed by a cleaning step Florisil. All the analytes separation was achieved by HPLC coupled to mass spectrometer tandem operating mode multiple reaction monitoring (MRM) except the isomers within them.

All compounds were detected in minimum one sampling point, except that MeSBT which presence was not detectable in any sampling point, and total highest concentrations were found 0.55ppb, and 0.48 ppb 0,49ppb areas high industrial activity, moreover the found concentrations are low compared to previous studies of other rivers of Catalonia.

2. OBJETIVOS

Este trabajo final de grado se realizó con los siguientes objetivos:

- Estudiar, en base a ciertas propiedades fisicoquímicas generales, pH, conductividad y temperatura, la relación existente entre el río Francolí, y las poblaciones, industrias y otras actividades de producción a lo largo de todas las comarcas y municipios por donde este discurre, las cuales de una manera u otra tienen cierta influencia sobre el mismo.
- Determinar un grupo de contaminantes emergentes, benzotriazoles (BTRs), benzotiazoles (BTs) y bencenosulfonamidas (BSAs), que pueden estar presente en concentraciones apreciables en muestras de agua del Río Francolí por la influencia de las zonas industrializadas, mediante LC-ESI-MS/MS
- Generar información de las condiciones generales del río que pueda ser utilizada para la posible realización de futuros proyectos de recuperación y mejora ambiental.

3. ANTECEDENTES

El *Program d'Aprenentatge Servei* busca relacionar el servicio a la comunidad con el proceso de aprendizaje, con este objetivo propone que los participantes trabajen las necesidades reales del entorno para mejorarlo. A partir de esta propuesta, este proyecto busca caracterizar el río Francolí en base a ciertas propiedades química, pH, conductividad y temperatura, así como determinar un grupo de contaminantes emergente (benzotriazoles, benzotiazoles y benzenosulfonamidas), presentes normalmente en productos de uso doméstico e industrial, y centrándose en todo el recorrido del mismo, desde su origen en la Espluga de Francolí hasta la desembocadura en Tarragona.

El proyecto contó con la colaboración de *Mare-Terra Fundació Mediterrànea*, una entidad sin ánimos de lucros cuya misión es fomentar la conservación y recuperación del entorno y crear alternativas para que el desarrollo sostenible sea una realidad. Y que además cuenta, desde enero del 2015, con la custodia de un tramo del río, de la riera de Riu Clar y su entorno en el municipio de Tarragona, lo que despierta su interés en la obtención de información relacionada con la calidad de las aguas de este río.^[1]

4. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente solo el 2,5% del volumen total de agua en el Planeta es agua dulce y de este porcentaje menos del 0,01% es accesible para satisfacer la creciente demanda que suponen las actividades de consumo humano.^[2] Todos sabemos que el agua es un elemento necesario para la supervivencia de todos los organismos vivos en el Planeta Tierra, y la posibilidad de que un recurso tan importante escasee en un futuro no muy lejano conlleva la necesidad de realizar estudios relacionados con la calidad del agua de río, tradicionalmente se realizan estudios parciales que se basan en comparar parámetros determinados experimentalmente con la normativa existente.^[3,4]

El Francolí es uno de los principales ríos de la provincia de Tarragona, tiene un corto recorrido, con una extensión de 853 km² y un caudal muy irregular con gran dependencia de las aguas de lluvia y de los cursos intermitentes que le aportan un mayor caudal. Aunque el río ya se conoce como Francolí desde el municipio de Vimbodí, oficialmente su origen se ubica en la denominada **Font Major** en la **Espluga de Francolí**, que se encuentra situada en el casco urbano de esta población. Desde aquí y hasta el mar el río recorre apenas 59 kilómetros a través de montañas costeras que pasan por ciudades como Montblanc y la Riba, y durante los cuales va recogiendo las aguas de otros afluentes siendo los principales, tanto por dimensiones de la cuenca como por el caudal aportado, el río de **Anguera** y el **Brugent**^[5, 6,7,8]

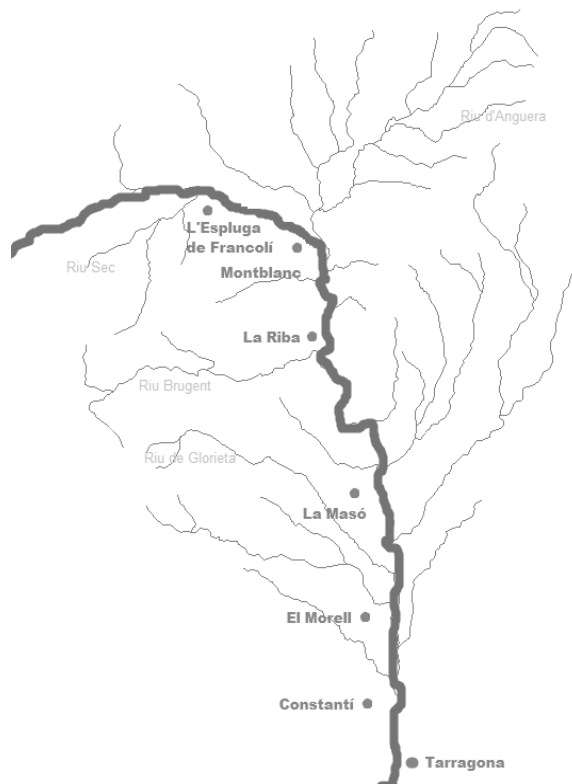


Figura-4.1 Representación de las distintas poblaciones por donde discurre el río Francolí y sus principales afluentes.

El aumento de las actividades humanas en las cercanías del río generan beneficios económicos pero conllevan problemas medio ambientales relevantes que exponen la calidad de sus aguas. Poblaciones por las que discurre este río presentan una alta actividad industrial, por ejemplo encontramos empresas como Repsol química en el Morell o carburos metálicos en la Poble de Mafumet. De igual manera, se encuentran diferentes depurados en servicio en la zona del Francolí que utilizan el río o algunos de sus principales afluentes como puntos de vertido.

Uno de los problemas que acarrea la presencia de estas empresas, es la posible existencia de los conocidos contaminantes emergentes, que son compuestos de los que se dispone relativamente poca información sobre su naturaleza química o el efecto que pueden causar en el medio ambiente y por tanto precisan ser investigados. Los derivados del BTR, del BTS y de la BSA son compuestos ampliamente utilizados en

diversos procesos industriales y en muchos productos del hogar, además tienen una alta solubilidad en agua y resistencia a la biodegradación, por lo que son considerados como contaminantes emergentes. ^[9,10]

Algunos de los derivados del benzotriazol más representativos, por ejemplo el 4 y el 5-metilbenzotriazol (4TTR/5TTR) o el 5,6-dimetilbenzotriazol (XTR), suelen estar presentes en detergentes para lavavajillas, formulas anticongelantes, sistemas de refrigeración industriales, líquidos para frenos, entre otros o como estabilizadores en plásticos. Por otra parte, los derivados del benzotriazol también se utilizan como inhibidores de la corrosión, o en la fabricación de papel, madera y cuero, y de forma predominante como acelerador de la vulcanización en la producción de caucho. ^[9-14] Y en cuanto a los derivados de la bencenosulfonamida tienen aplicaciones diversas como plastificantes, fungicidas y productos intermedios en la síntesis de pesticidas, medicamentos, edulcorantes y colorantes, por ejemplo, el para-toluenosulfonamida (p-TSA) se utiliza como tratamiento para enfermedades en algunos animales de granja o como desinfectante de máquinas de la industria alimentaria, el orto-toluenosulfonamida (o-TSA) en el proceso de producción de la sacarina y el N-etil-p-toluenosulfonamida (Et-p-TSA) como plastificante. ^[9, 10, 13]

Muchos estudios previos utilizan la extracción en fase sólida (SPE) como procedimiento de pretratamiento de la muestra usando adsorbentes típicos de fase inversa, como OASIS HLB, aunque también suelen quedarse retenidas algunas de las interferencias presentes en la matriz y para reducir el efecto matriz es necesario añadir una etapa de lavado adicional. ^[9,14,15,16] En cuanto al análisis cromatográfico de estos analitos en muestras medio ambientales, se suele utilizar cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases bidimensional (GC × GC) acoplada a detectores de espectroscopia de masa simple (MS), en tándem (MS / MS) o de alta resolución (HRMS). ^[9,10]

En el apartado 5 de la Instrucción de Planificación Hidrográfica (IPH) ^[17] se indica que el estado de las masas de aguas superficiales se obtiene mediante la combinación del estado ecológico y el estado químico. A su vez el estado ecológico se determina por la combinación de indicadores biológicos, físico-químicos e hidromorfológicos, según se establece en la Directiva Marco del Agua (DMA) ^[18], y cuando se trata de aguas naturales se clasifican en cinco clases: Muy bueno, Bueno, Moderado, Deficiente o Malo. Por otra parte el estado químico, es analizado en base al Reglamento de Planificación Hidrológica y la Directiva 2008/105/CE ^[19] en la cual se hace referencia a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.

En este estudio solo nos centraremos en algunos de los indicadores generales de las propiedades físico-químicas incluidas en la determinación del estado ecológico, por tanto, la información proporcionada solo dará una visión parcial de la calidad del agua del río Francolí.

El primer parámetro analizado fue la temperatura, es uno de los parámetros físico-químico más importante ya que influye de forma significativa en las especies acuáticas determinando su metabolismo, respiración y la descomposición de materia orgánica. La temperatura óptima para el desarrollo se encuentra comprendida en el rango de 25°C a 35°C, estos procesos se inhiben cuando se llega a los 50°C, mientras

que por debajo de 15°C las bacterias productoras de metano cesan su actividad. Por otra parte también es factor que condiciona otras propiedades fisicoquímicas como el pH, la densidad, el potencial redox, entre otras. ^[20]

El siguiente parámetro analizado fue el pH, término relacionado con la acidez o basicidad de las soluciones. El pH influye en algunos fenómenos que ocurren en el agua, como la corrosión. Según los valores de corte entre la clase de estado bueno/moderado de la IPH, las aguas naturales exhiben un pH entre 6 y 9, es decir, entre neutra y ligeramente alcalina. Aguas con pH inferiores a 6 son corrosivas debido al anhídrido carbónico, ácido o sales ácidas que tienen en disolución.

Finalmente, la conductividad, expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones y de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas así como de la temperatura de medición. Cuanto mayor sea la concentración de iones mayor será la conductividad.

Con este trabajo se busca relacionar la influencia que tienen la población y algunas actividades de producción, como la industria, con el río Francolí a lo largo de todo su recorrido, así como también aplicar un método ya validado para la determinación de un grupo de contaminantes emergentes, benzotriazoles, benzotiazoles y bencenosulfonamidas, en muestras recogidas en diferentes puntos de dicho río.

5. FUNDAMENTOS

5.1 Espectroscopia de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se fundamenta en la separación de partículas moleculares por su diferente masa, generando iones a través de la interacción de electrones acelerados por un campo eléctrico que adquieren una energía cinética considerable pudiendo así interactuar con moléculas (M) (ecuación 5.1) y separándolos por su relación de masa/carga (m/z) y para detectar cualitativamente y cuantitativamente por su respectiva m/z y abundancia, y proporcionando información tanto de la masa molecular como de la estructura molecular, permitiendo así la identificación de sustancias. ^[21]



Si a una molécula se le suministra una determinada energía para su ionización, esta se descompone siguiendo un patrón concreto en el que se obtienen siempre los mismos fragmentos y en la misma relación de intensidad, por lo tanto, los iones así generados son detectados como corrientes iónicas cuyas intensidades son proporcionales a sus abundancias respectivas, permitiendo así la identificación inequívoca de las moléculas, mediante la representación gráfica en el espectro de masas.

5.1.1-. Instrumentación ^[22]

En la figura 5.1 se muestra de forma simplificada las partes principales de un espectrómetro de masas.

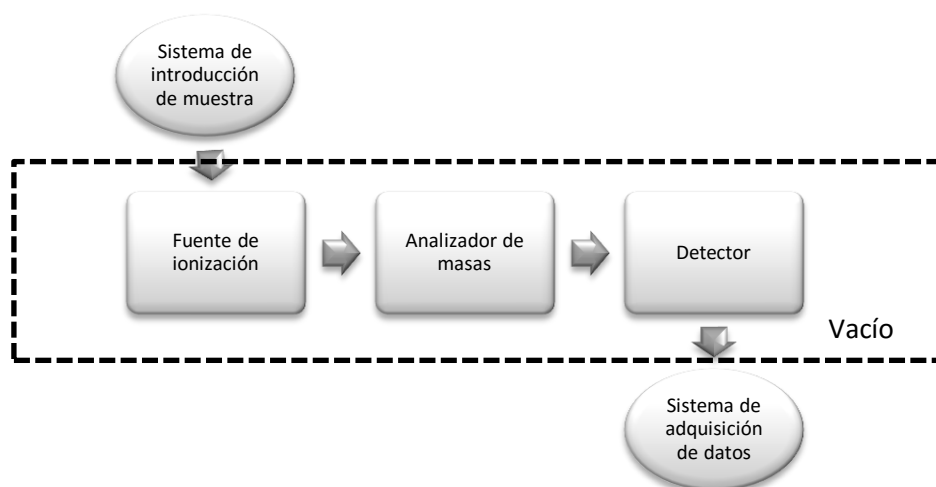


Figura 5.1-. Diagrama de bloques de las principales partes de un espectrómetro de masas.

Como se observa en la figura 5.1, los espectrómetros de masas son instrumentos sofisticados que en general constan de tres partes fundamentales, una fuente de ionización, donde se produce la fragmentación molecular característica de cada compuesto, un analizador de masas que separa los fragmentos iónicos generados en función de su relación m/z y un detector que recoge y caracteriza los fragmentos iónicos que salen del analizador, además todo el sistema se encuentra sometido a vacío para evitar colisiones entre los fragmentos iónicos generados.

5.1.1.1-. Sistema de introducción de muestras.

Busca introducir cantidades pequeñas de muestra, normalmente contiene un medio que permite la volatilización. Hay tres tipos de métodos para introducir la muestra, según la naturaleza de la misma: indirecta, si la vaporización de la muestra se realiza en un recipiente externo, directa, cuando se introduce directamente en la fuente de ionización o a partir de un cromatógrafo.

5.1.1.2-. Fuente de ionización.

Su función es crear iones en fase gas, esto se puede conseguir por ionización por impacto o bombardeo electrónico, o por ionización química, también puede lograrse la ionización mediante energía térmica o eléctrica. Existen numerosas fuentes de ionización, en la tabla 5.1 se resumen algunas de las fuentes de ionización más utilizadas, y la elección de la más idónea depende principalmente de la aplicación.

Como se puede observar en la tabla 5.1, las fuentes se pueden clasificar en dos categorías diferentes; las **fuentes de fase gas**, en las cuales la muestra primero es volatilizada y después ionizada, y las de **fuentes de desorción**, donde la energía se transmite directamente a la fase sólida o líquida, eliminando la vaporización de la muestra, y produciéndose la ionización y la transferencia directa de iones de la fase

condensada al estado gaseoso. La principal ventaja de la ionización por desorción es que permite trabajar con moléculas volátiles y térmicamente inestables.

Otra forma de clasificar las fuentes de ionización es en **duras** o **blandas**, dependiendo de si comunican elevadas energías a los iones formados y generan de esta forma iones excitados, los cuales al relajarse producen una gran cantidad de fragmentación y por consiguiente un espectro masas de gran complejidad. O si por el contrario, producen relativamente poca excitación y por tanto espectros más sencillos.

Tabla 5.1 Fuentes de ionización en espectrometría de masas

Tipo	Nombre y acrónimo	Agente ionizante
Fase Gas	Ionización por electrones (EI)	Electrones energéticos
	Ionización química (CI)	Iones reactivos
	Ionización por campo (FI)	Electrodo de elevado potencial
Desorción	Desorción por campo (FD)	Electrodo de elevado potencial
	Ionización por electrospray (ESI)	Campo eléctrico elevado
	Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Haz de átomos energéticos
	Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)	Iones energéticos
	Desorción/ ionización asistida por una matriz (MALDI)	Haz de láser
	Ionización por termonebulización (TS)	Elevada temperatura

A continuación se presenta una pequeña descripción de una de las fuentes de ionización más utilizadas en la determinación de benzotriazoles, benzotiazoles y bencenosulfonamidas, compuestos de interés de este estudio.

Ionización por electrospray (ESI)

La muestra es disuelta en un solvente polar y volátil, y se transporta, a través de un fino capilar de acero inoxidable, a una zona de alto potencial, positivo o negativo. La gran diferencia de potencial entre el capilar y la boquilla de salida crea un spray electrostático de múltiples gotas cargas. Este proceso es asistido por una corriente de nitrógeno gas (conocido como gas nebulizador). Los iones son formados a presión atmosférica y pasan a través de un orificio con forma cónica hacia una zona de vacío creciente. En la figura 5.2 se esquematiza el proceso de ionización por electrospray.

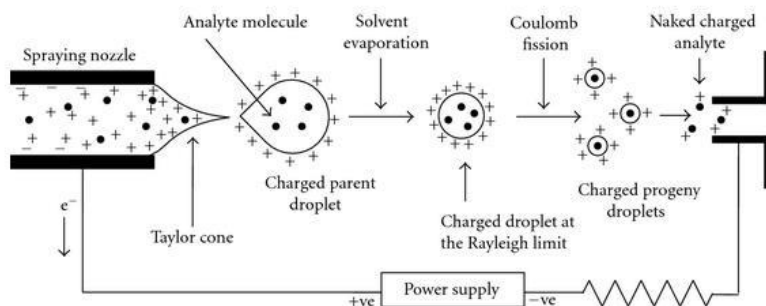


Figura 5.2-. Esquema del funcionamiento de la ionización por electrospray. Fuente: América Pink. Electrospray ionization. http://america.pink/electrospray-ionization_1404975.html. (Fecha de consulta: 10 de mayo del 2016).

La técnica Ionización por Electrospray (ESI), es considerada una técnica de ionización blanda, ya que es muy poca la energía trasferida a la molécula, en comparación a la requerida para producir la ionización. Así se generan compuestos protonados, desprotonados o moléculas catiónicas que sufren muy poca fragmentación, incluso aunque provengan de sustancias termolábiles muy polares. Es una de las técnicas más importantes para el análisis de moléculas de alto peso molecular y es mucho más utilizada en comparación a otras técnicas de ionización a presión atmosférica (figura 5.3).

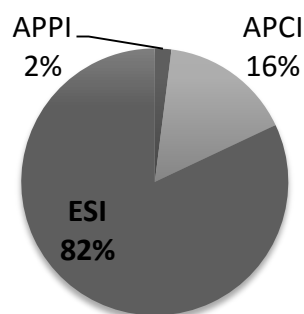


Figura 5.3-. Uso relativo de las técnicas de ionización a presión atmosférica individuales en artículos de LC-MS, basado en la Web of Science, marzo 2012.

5.1.1.3-. Analizadores de masas.

Una vez se tiene la mezcla de diversos iones el analizador de masas los separa en función de su relación m/z e independientemente de la conformación química de las especies. La capacidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre masas próximas viene dada por la ecuación 5. 2, donde R es la resolución, m la masa nominal del primer pico y Δm la diferencia de masas entre dos picos adyacentes.

$$R = m / \Delta m \quad [5.2]$$

La separación entre picos se estudia en función a la altura del valle que separa dos picos consecutivos, considerándose estos separados si dicha altura es inferior a generalmente un 10 % de la altura de estos. Por otra parte la exactitud compara el valor registrado de m/z con el valor verdadero, siguiendo la ecuación 5.3, y expresado en partes por millón.

$$Exactitud(ppm) = \left[\frac{M_{medida} - M_{teórica}}{M_{teórica}} \right] \times 10^6 \quad [5.3]$$

Una explicación detallada del funcionamiento de los diferentes analizadores de masas excede el alcance de este estudio, más adelante se comentaran los beneficios de trabajar con analizadores acoplados.

5.1.1.4-. Detectores.

Después de que se produzca la separación de los iones en el analizador del espectrómetro de masas, éstos deben ser detectados, la forma en la cual serán detectados dependerá fundamentalmente de cómo se efectuó la separación de los iones, es decir del tipo de analizador utilizado.

Un detector convierte la energía de las partículas entrantes en una señal de corriente eléctrica que puede ser procesada por los dispositivos electrónicos y se transfiere al equipo de sistema de adquisición del espectrómetro de masas. El detector más empleado es el multiplicador de electrones (Figura 5.4), cuya superficie interna

está hecha de un material emisor. Un ion positivo o negativo proveniente del analizador y registrado en el dinodo de conversión causa la emisión de varias partículas secundarias, las cuales a su vez pueden dar lugar a iones positivos y negativos así como a partículas neutras, al chocar el ion con el dinodo de conversión de alto voltaje provoca la emisión de electrones donde un haz de iones incide sobre un cátodo, arrancando electrones, y estos, acelerados por el incremento de potencial, vuelven a chocar generando más electrones y produciendo una amplificación en la señal.

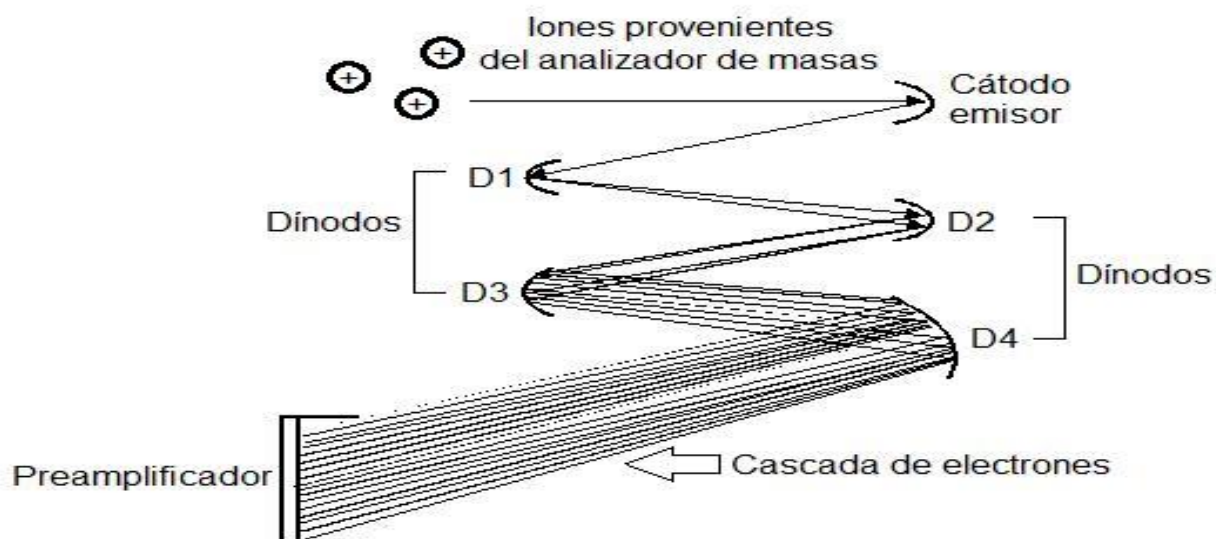


Figura-5.4 Esquema del funcionamiento de un multiplicador de electrones. Fuente: UNAD. Espectroscopia. <http://datateca.unad.edu.co/contenidos>. (Fecha de consulta: 12 de mayo del 2016).

5.2 Espectroscopia de masas en tándem (MS/MS)

Cuando la información proporcionada por método de ionización seleccionado no es suficiente, se puede optar por utilizar dos analizadores acoplados y separados por una celda de colisión, esta estructura es lo que conocemos como espectroscopia de masas en tándem, y nos proporciona la información estructural de las moléculas presentes en nuestra muestra, usando múltiples etapas de selección y separación de masas. ^[23,24]

Pueden existir diferentes formas de combinar los analizadores en función a diferentes factores, como la selectividad o la sensibilidad que requiera el análisis a realizar, pero las más comunes son tándem en el espacio (Fig-5.5.a), por el acoplamiento de dos espectrómetros de masas, o tándem en el tiempo (Fig-5.5.b), por la utilización de una secuencia apropiada de ionizaciones en un dispositivo de almacenamiento de iones. ^[20]

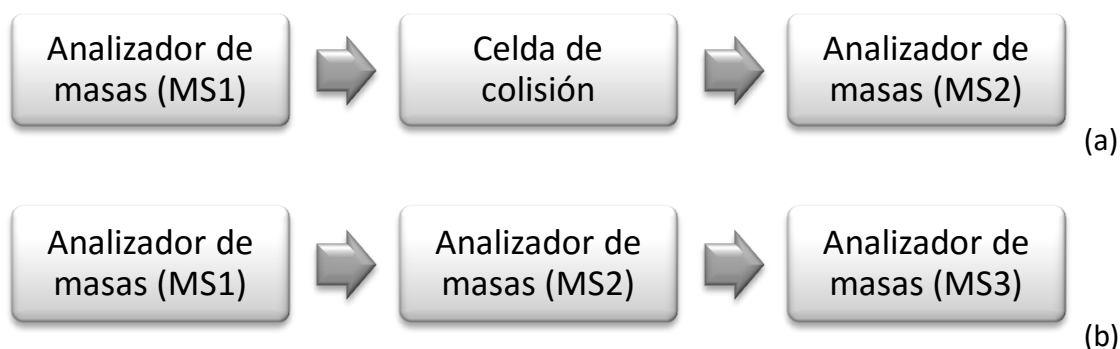


Figura-.5.5 Diagrama de bloque de un espectrómetro de masa en tándem en el espacio (a) y en el tiempo (b)

En el tándem en el espacio, en el primer analizador se selecciona el compuesto de interés, el cual luego pasa a la celda de colisión, donde se induce a la disociación del ion. El ion original es conocido como precursor y los iones disociados como iones producto o iones hijos, lo cuales posteriormente son analizados en el segundo espectrómetro. Por otra parte en el tándem en el tiempo, los iones producidos por la fuente de ionización, son fragmentados y separados por su relación m/z en el mismo espacio físico.^[23]

La espectrometría de masas en tándem puede ser utilizada como una técnica de cuantificación o de cribado (figura 5.6). Para cuantificar se puede trabajar con el **monitoreo de reacción múltiples (MRM)**, que consiste en registrar transiciones entre dos estados del ion seleccionado, en el primer espectrómetro es programado para transmitir el primer ion o ion precursor a la celda de colisión, y luego uno de sus iones producto o hijos, es monitorizado después del segundo espectrómetro, monitorizando las correspondientes intensidades de los iones producto se puede cuantificar analitos.^[25]

Cuando se quiere utilizar como una técnica de cribado existen dos alternativas; el **escaneo de iones precursores (precursor ion scanning)** y el **escaneo de pérdida neutra constante (constant neutral loss)**. En el primer caso, en el primer espectrómetro se realiza un escaneo, mientras que el segundo espectrómetro es programado estáticamente para transmitir iones producto de una única relación de m/z seleccionada, por lo tanto solo se registrará la señal de los iones hijos dicha relación m/z . En el método de escaneo de pérdida neutra constante, ambos espectrómetros están escaneando simultáneamente pero distanciados por un cierto valor de masa que corresponde a la diferencia entre el ion precursor y las masas de los iones producto.^[25]

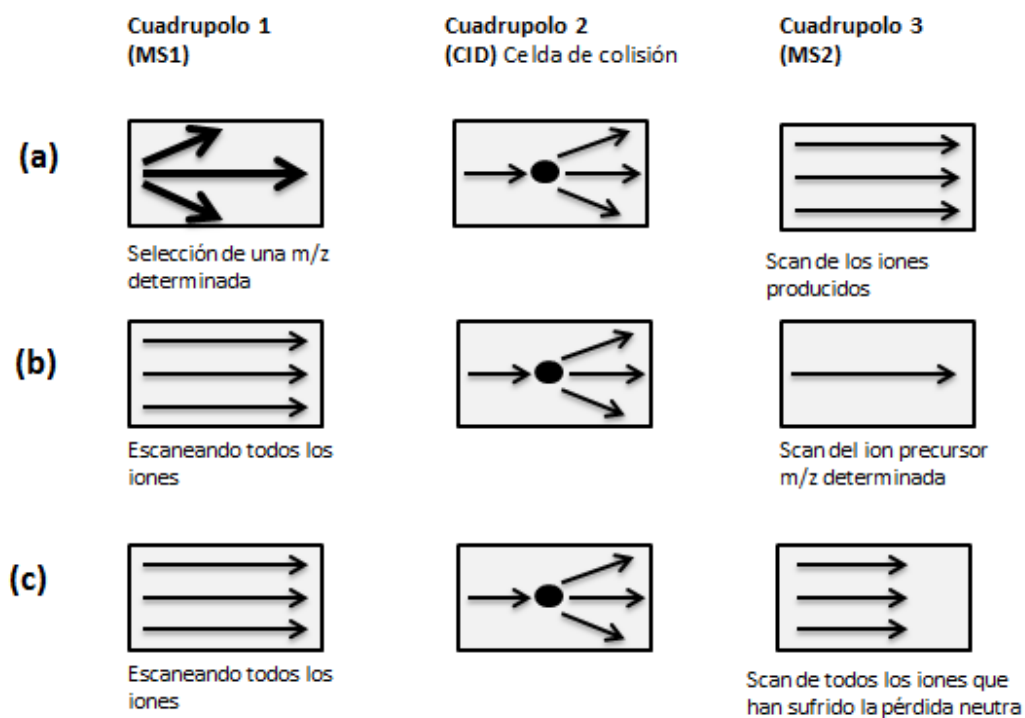


Figura-.5.6 Tipos de registros en espectrometría de masas en tándem.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Reactivos y materiales

En la tabla 6.1 se resumen los reactivos utilizados, se especifica la etapa del proceso experimental en el que fueron utilizados, su toxicidad y las prevenciones que se deben tomar para su manipulación.

Tabla 6.1 Reactivos utilizados, toxicidad y prevenciones.

Reactivo	Uso	Toxicidad	Prevenciones
Metanol ^[26]	- Disolvente SPE - Disolvente solución intermedia - Fase móvil LC	Tóxico e inflamable	Utilizar guantes, bata y gafas. Trabajar en campana
Acetonitrilo ^[27]	- Limpieza SPE - Fase móvil LC	Inflamable. Nocivo e irritante.	Utilizar guantes, bata y gafas. Trabajar en campana
Ácido Acético ^[28]	Ajuste de pH en la fase móvil	Inflamable, corrosivo y peligroso para el medio ambiente.	Utilizar guantes, bata y gafas. Trabajar en campana

Por otra parte se utilizaron una serie de materiales en cada etapa del análisis, lo cuales se especifican en la tabla 6.2.

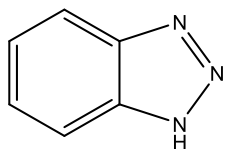
Tabla 6.2 Materiales utilizados en las diferentes etapas del estudio.

Etapas	Material
Toma y filtrado de muestra	Botellas de polietileno (2L) Filtros de fibra de vidrio (1,2 µm)
Medición de propiedades físico-químicas	Medidor de pH digital Hanna Conductímetro portátil digital Hanna
Extracción en fase sólida	Cartucho Oasis HLB (150 mg, 6 cc) Cartuchos SPE laboratorio repleto Florisil (6cc) Bomba de vacío conectada a un colector Filtro PTFE (0,22µm)
Cromatografía de líquidos	Cromatógrafo líquido Agilent serie 1200 Espectrómetro de masa de triple cuadrupolo serie 6410 con una interfaz ESI Columna Kinetex PFP (100 x 2,1 mm, 2,7µm)

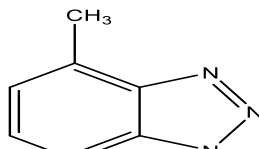
6.2 Soluciones intermedias y patrones

Se disponía de patrones individuales de 1000ppm de concentración, de cinco derivados de benzotriazol: benzotriazol (BTR), 4-metilbenzotriazol (4TTR), 5-metilbenzotriazol (5TTR), 5,6-dimetilbenzotriazol (XTR) y 5-clorobenzotriazol (ClBTR); tres derivados de benzotiazol: 2-aminobenzotiazol (NH₂BT), 2-hidroxibenzotiazol (OBT) y 2-(metiltio)-benzotiazol (MeSBT); y cuatro derivados de bencenosulfonamida: bencenosulfonamida (BSA), orto-toluenesulfonamida (o-TSA), para-toluenesulfonamida (p-TSA), N-etil-p-toluenesulfonamida (Et-p-TSA), cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 7.1 y a partir de los cuales se preparó un solución intermedia mixta de 10ppm en metanol y seguidamente otra disolución de 1ppm a partir de la cual se realizaron los patrones de diferentes concentraciones entre 1 y 200ppb.

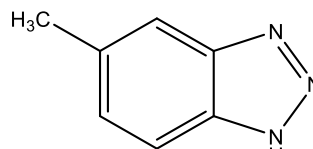
Benzotriazoles



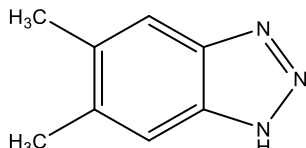
Benzotriazol (BTR)



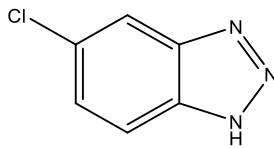
4-metilbenzotriazol (4TTR)



5-metilbenzotriazol (5TTR)

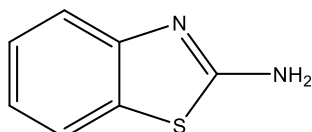


5,6-dimetilbenzotriazol (XTR)

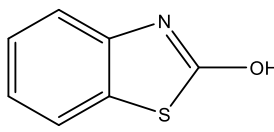


5-clorobenzotriazol (ClBTR)

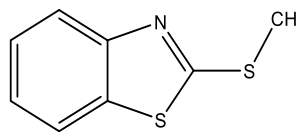
Benzotiazoles



2-aminobenzotiazol (NH₂BT)

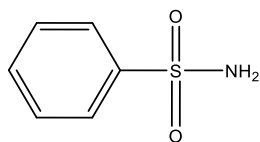


2-hidroxibenzotiazol (OHBT)

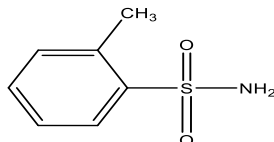


2-(metiltio)-benzotiazol (MeSBT)

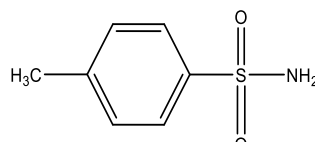
Benzenesulfonamidas



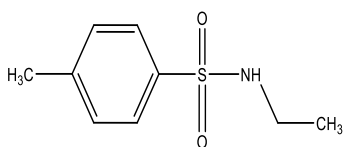
Benzenesulfonamida (BSA)



o-toluenosulfonamida (o-TSA)



p-toluenosulfonamida (p-TSA)



N-etil-p-toluenosulfonamida (Et-p-TSA)

Figura-.6.1 Estructuras química de los analitos de interés

6.3 Muestreo

Con el objetivo de caracterizar todo el recorrido del río y relacionar su calidad con la actividad humana, se seleccionaron ocho puntos cercanos a diferentes poblaciones e industrias de la zona, mostrados en la figura 6.2 junto a un resumen de la población y actividades económicas de los mismos. De estos, dos puntos, la Espluga de Francolí (A: 41.3983962, 1.1044770) y Vía Roma (H: 41.116039, 1.1236588) fueron seleccionados por ser el nacimiento y la desembocadura del río, respectivamente. Los puntos de Montblanc (B: 41.3802506, 1.1614968) y la Riba (C: 41.3049749, 1.1963158) se seleccionaron por su relación con principales afluentes del río. Por otra parte, la selección de los puntos de la Masó (D: 41.247879, 1.222657), el Morrell (E: 41.2472395, 1.222577) y Sant Salvador (F: 41.15299, 1.234598) está relacionada con la actividad industrial de la zona, y el punto de Escola Natura (G:, 41.128162, 1.231759) por ser la zona de custodia de la *Fundació Mare- Terra Mediterrànea*.

Las muestras se recogieron en botellas de polietileno de un volumen de dos litros y una vez en el laboratorio, se filtraron con filtros de fibra de vidrio de $1,2\ \mu\text{m}$ y se refrigeraron a 4C° para su posterior tratamiento y análisis.

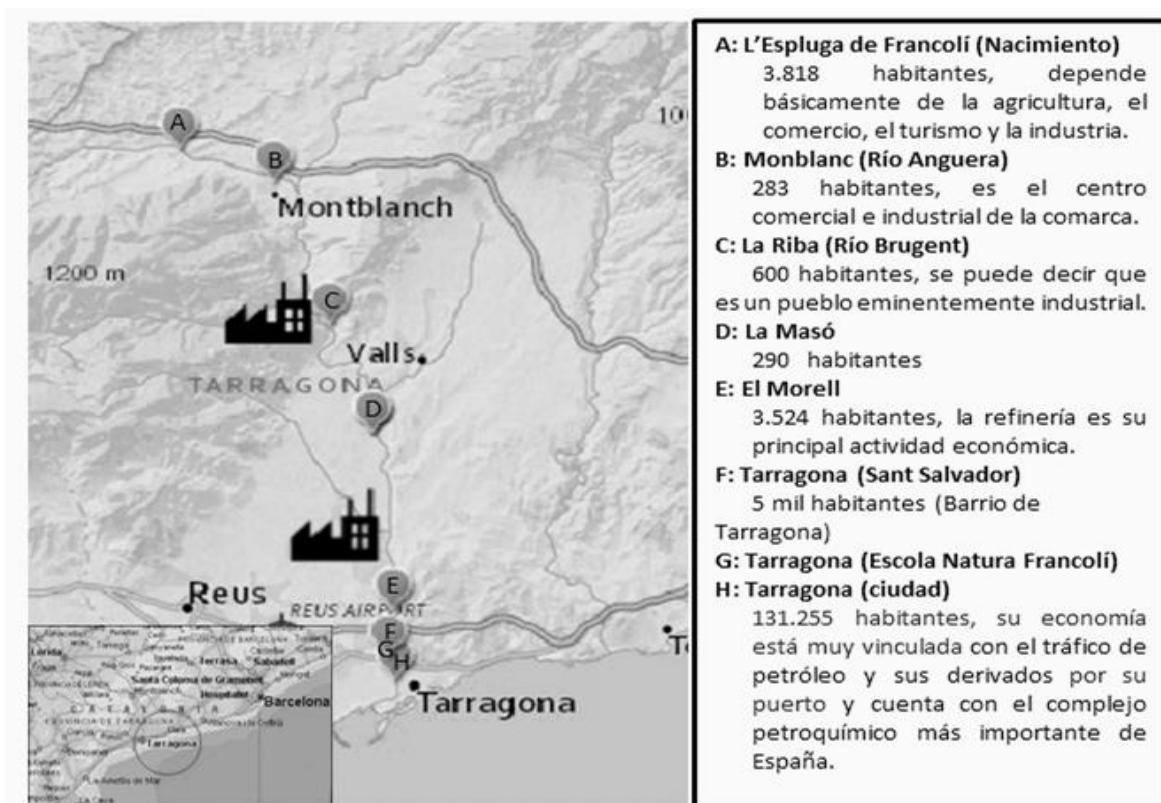


Figura-6.2 Puntos de muestreo, principales industrias de la zona y resumen de la población y principales económicas de estos puntos.

Para la selección de dichos puntos de muestreo se tuvieron en cuenta ciertas consideraciones previas; se hizo una recolección de información relacionada con la población y las actividades económicas de cada uno de los puntos, y posteriormente se confirmó la accesibilidad de los mismos, motivo por el cual se descartaron algunas de las opciones de partida.

A continuación se presenta una breve descripción, que incluye algunos aspectos que pueden influir en los resultados del estudio, de los puntos de muestreos seleccionados en base a estas consideraciones previas:

A. L'Espluga de Francolí^[29]

Municipio situado en el extremo suroriental de la Conca de Barberá, su nombre hace referencia a las numerosas grutas y cavidades de los alrededores, entre las cuales cabe destacar la cueva de la Font Major, por donde discurre bajo tierra el río Francolí.

Contaba con una población de 3.818 habitantes para el año 2015, según datos del Instituto de Estadística de Cataluña (idescat), una superficie de $57,00\ \text{Km}^2$ y una

altitud de 411 metros.^[30] Tiene una temperatura media anual de 14°C y las precipitaciones medias anuales son de aproximadamente 580mm. Como previamente se comentó, oficialmente se considera que el río Francolí nace en la Font Major, en la confluencia de los ríos Sec y Milans.

La actividad económica depende básicamente de la agricultura, el comercio, el turismo y la industria. Pudiendo destacar el centro de tratamiento de residuos de la Conca de Barberá, así como la planta de compostaje, donde se transforma la materia orgánica recibida en compost.

B. Montblanc (Río Anguera)^[31]

Es la capital de la Conca de Barberà, se encuentra al sur de la misma, en el centro de la depresión formada por los ríos Anguera y Francolí, presenta unos 7.283 habitantes entre el núcleo de la población y las pedanías, una superficie de 91,10 Km² y una altitud de 350 metros.^[30] Su temperatura y precipitaciones medias anuales se encuentran alrededor de 14,5 °C y 564mm, respectivamente.

Es el centro comercial e industrial de la comarca, y uno de los puntos del interior de la demarcación con más interés desde el punto de vista turístico. Entre las empresas destacadas podemos nombrar el polígono industrial plans de jori, plaets Monblanc, entre muchas otras.

C. La Riba (Río Brugent)^[32]

Se trata de un municipio pequeño situado al noroeste de la comarca del Alt Camp, se encuentra justo en el límite de tres regiones diferentes: el Camp de Tarragona, las montañas de Prades y la Conca de Barberá. Por el discurre el río Francolí, el cual recibe aguas del Brugent, río que nace cerca de Capafons. Tiene una población de aproximadamente 600 habitantes, una superficie de 8,00 Km² y una altitud de 263 metros.^[30] Tiene una temperatura media anual de 15°C y las precipitaciones medias anuales son de aproximadamente 559mm.

En cuanto a su actividad económica, se puede decir que es un pueblo eminentemente industrial, ya que acoge molinos tanto harineros como de papel, localizados dentro del núcleo urbano o en las orillas fluviales tanto del Brugent como del Francolí. La agricultura y la ganadería son actividades que se practican generalmente para el autoconsumo.

D. La Masó^[33]

Es un pequeño municipio de la comarca de Alt Camp, se extiende a la derecha del Francolí en su mayor parte, se encuentra situado muy cerca del polígono químico de Tarragona. Tiene una población de aproximadamente 290 habitantes, una

superficie de 3,60 Km² y una altitud de 115 metros.^[30] Tiene una temperatura media anual de 15,7°C y las precipitaciones medias anuales son de aproximadamente 551mm.

E. El Morell^[34]

El Morell municipio de la comarca del Tarragonès, tiene una población de aproximadamente 3.524 habitantes, una superficie de 5,90 Km², una altitud de 104 metros,^[30] una temperatura media anual de 15,8°C y precipitaciones medias anuales 555mm. A partir de la década de 1970 se instaló una refinería que se ha convertido en la principal actividad económica, reduciendo así la importancia del cultivo. En el polígono industrial del Morrell encontramos empresas como Transformadora de propileno EIE o carburos metálicos.

F. Tarragona (ciudad)^[35]

Capital de la provincia de Tarragona y la comarca del Tarragonés, tiene una superficie de aproximadamente 57,90 Km², una altitud de 68 metros sobre el nivel del mar, es el territorio más extenso y poblado de la comarca, con una población de 131.255 habitantes.^[30] La temperatura media anual es muy suave y se sitúa alrededor de los 16,1°C con precipitaciones de 560mm.

En su actividad económica tiene gran importancia la actividad económica el puerto tiene gran relevancia, está vinculado con el tráfico de petróleo y sus derivados, cereales y carbón. Cuenta con el complejo petroquímico más importante de España.

Además de considerar los aspectos antes descritos (población, superficie, altitud, clima y actividades económicas) también se ha considerado la presencia de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), las cuales utilizan al Francolí o algunos de sus principales afluentes como puntos de abocamiento. En la tabla 6.3 se presenta un resumen de diferentes aspectos relacionados con dichas EDARs.

Tabla 6.3. EDARs en la zona del Francolí ^[36]

	Administración actuante	Empresa explotadora	Municipios asistidos:	Cuenca	Punto de vertido
Alcover	Ayuntamiento Alcover	AQUAMBIENTE SERVICIOS PARA EL SECTOR DEL AGUA SAU	ALCOVER	El Francolí	Río Glorieta
Alió	Ayuntamiento Alió	Ayuntamiento Alió	ALIÓ	El Francolí	Barranc Fonollosa
L'Espluga de Fracolí	Consejo Comarcal de la Conca de Barberá	UTE CONCA DE BARBERÀ (DAMACCIONA)	ESPLUGA DE FRANCOLÍ; VIMBODÍ	El Francolí	El Francolí
Montblanc	Consejo Comarcal de la Conca de Barberá	UTE CONCA DE BARBERÀ (DAMACCIONA)	MONTBLANC	El Francolí	Río Anguera
Perafort (Poble)	Ayuntamiento Perafort	Ayuntamiento Perafort	PERAFORT	El Francolí	Torrent dels Garidells (El Francolí)
Perafort (Puigdelfí)	Ayuntamiento Perafort	Ayuntamiento Perafort	PERAFORT (Puigdelfí)	El Francolí	Barranc del Bogatell
Pla de Santa Maria	Agencia Catalana del Agua	AQUAMBIENTE SERVICIOS PARA EL SECTOR DEL AGUA SAU	El pla de santa Maria	El Francolí	Barranc de Sant Francesc
la Pobla de Mafumet	Ayuntamiento la Pobla de Mafumet	EMATSA	LA POBLA DE MAFUMET; MORELL, VILALLONGA DEL CAMP	El Francolí	El Francolí

La Secuita	Ayuntamiento la Secuita	EMATSA	La Secuita	El Francolí	El Francolí
La selva del Camp	Consell Comarcal del Baix Camp	COMAIGUA, SL	SELVA DEL CAMP (La Selva del Camp, Paretdelgada, Sant Pere)	El Francolí	Riera de la Selva
Solivella	Consell Comarcal de la Conca de Barberà	UTE CONCA DE BARBERÀ (DAMACCIONA)	SOLIVELLA	El Francolí	Rasa del Molí
Tarragona	Ayuntamiento Tarragona	EMATSA	CONSTANTÍ; ELS PALLARESOS; TARRAGONA	El Francolí	Riu clar
Valls (Poble)	Ayuntamiento Valls	UTE ELECTROMECHANICA AQUAGEST	VALLS (Valls i efluent EDAR polígon industrial de Valls)	El Francolí	Torrent del Puig
VALLS Polígon industrial	Ayuntamiento Valls	UTE ELECTROMECHANICA AQUAGEST	VALLS (Polígon industrial Valls)	El Francolí	EDAR Valls poble

6.4 Extracción en fase sólida (SPE)

Inicialmente las muestras fueron filtradas con un filtro de fibra de vidrio con un tamaño de poros de 1,2 μm . A continuación se siguió el procedimiento optimizado previamente por P. Herrero et al.(2014), en cual se utilizaron cartuchos Oasis HLB (150mg, 6cc) y cartuchos de 6cc con 500mg de Florisil, así como una bomba de vacío conectada a un colector.

En una primera etapa de acondicionamiento del cartucho Oasis HLB, cuyo objetivo es la activación del adsorbente, se utilizaron 5ml de metanol seguido por 5ml de agua ultrapura. Una vez acondicionado el cartucho, se pasaron 500mL de muestra previamente filtrada con un caudal de aproximadamente 10mL/min. Antes de la etapa de elución se pasaron 5mL de agua ultrapura a través del adsorbente y se secó al vacío, para eliminar los restos de compuesto que puedan interferir y las trazas de solvente. A continuación, el cartucho fue conectado a la parte superior de un cartucho de laboratorio previamente relleno con 500mg de Florisil y acondicionado con 5 mL de metanol, eluyendo los analitos con 2 x 3mL de metanol. El eluato fue recogido en un vial para posteriormente ser concentrado casi a sequedad (aprox. 100 μL) bajo un flujo de gas de nitrógeno y enrasándose hasta 1mL con agua ultrapura, el extracto es pasado por un filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 μm y se refrigeraron a -20°C hasta su inyección en el sistema cromatográfico.

Estudios previos demuestran que la opción más adecuada para la extracción de este tipo de analitos en matrices acuosas, por su alta polaridad, es la utilización de un sorbente polimérico con un equilibrio polar/apolar, aunque algunos estudios han presentado recuperaciones elevadas utilizando cartuchos de intercambio aniónico fuerte.^[9] En el mercado se pueden conseguir diferentes sorbentes para SPE (en la figura 6.4 se muestran algunos), para seleccionar el sorbente más adecuado se debe conocer la matriz de la muestra, la naturaleza y la concentración relativa de los analitos de interés, así como los compuestos que pueden provocar interferencias. Como se muestra en la figura 6.4 los cartuchos oasis HLB, presentan un sorbente polimérico con balance hidrofílico/lipofílico, de fase reversa, adecuado para la extracción en fase sólida de todo tipo de compuestos; neutros, básicos y ácidos. Su composición consiste en una proporción equilibrada de dos: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica), lo que proporciona una capacidad de retención mayor que la de los rellenos tradicionales de base sílice, como el C₁₈.^[37]

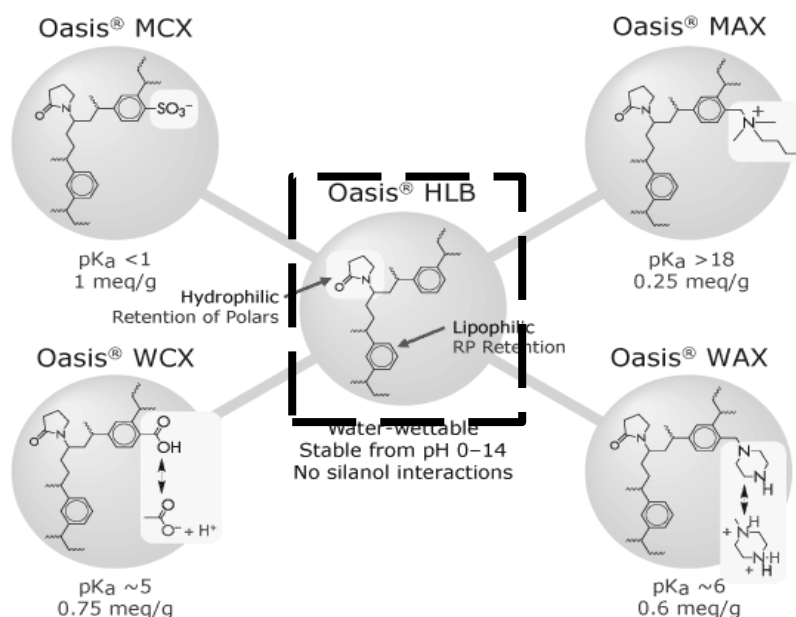


Figura-6.4 Representación esquemática de algunos de los tipos de cartuchos (Oasis) para SPE disponibles en el mercado. ^[37]

6.5 LC-(ESI), MS/MS

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 de rápida resolución acoplado a un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo serie 6410 con una interfaz ESI (Agilent Technologies). Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna Kinetex PFP (100 x 2,1 mm, 2,7µm) de Phenomenex, con un gradiente de elución con agua ultrapura/ACN (98:2) con un 0,1% de ácido acético (disolvente A) y metanol (disolvente B) como fase móvil, comenzaron a 0.5%B durante 5,25 min, luego se aumentó a un 18% en 3,5min, dejándose constante 1,25 min más para luego subir hasta un 95% en 3min y mantenerse en dicha condición 3min más antes de volver a las condiciones iniciales en 4 min. Aunque el tiempo de análisis alcanzó los 20 min, todos los analitos se eluyeron en aproximadamente 15 min. El volumen de inyección fue de 20µL, con un flujo de 0,6ml/min y la temperatura del horno se mantuvo a 50°C.

En cuanto a las condiciones del espectrómetro de masas, la presión del nebulizador fue de 45 psi, el flujo del gas de secado (N₂) de 11 L/min y la temperatura del mismo de 325°C, el voltaje del capilar de 3000V en modo positivo y -4500V en modo negativo. Los datos fueron adquiridos en modo de monitoreo múltiple de reacción (MRM) y se utilizaron los datos de voltaje del cono y las energías de colisión que especifica P. Herrero et al.(2014), junto con algunas transiciones características para cada compuesto.

Tanto las condiciones de la separación cromatografía como las condiciones del espectrómetro de masas se adaptaron a partir del estudio previo realizado por P. Herrero et al.(2014).

El monitoreo de reacciones múltiples (MRM), es un método de adquisición de corrientes iónicas que aumenta de forma visible la selectividad y la sensibilidad, consiste en registrar las transiciones (o reacciones de transición) entre los pares de iones (precursor y producto), en lugar de solo monitorear iones característicos. En el primer analizador MS1 se generan los iones precursores, operando en modo SIM, mientras que en el segundo analizador MS2 se dejan pasar solo iones productos de la transición o reacción de disociación precursor→producto, también en modo SIM. Ambos iones, deben ser estables y, por lo general, abundantes en el espectro de masas del analito. El monitoreo de la reacción de transición de iones precursor e hijo (ion producto), anula casi completamente la probabilidad de coincidencias de señales del analito con el ruido de fondo. Este método junto al estudio cromatográfico de los tiempos de retención permiten confirmar la presencia de un analito diana de forma prácticamente inequívoca y es especialmente útil cuando dichos analitos están a nivel traza en matrices muy contaminadas.^[38]

Todos los compuestos estudiados se ionizaron en el modo positivo como $[M + H]^+$, excepto el BSA, o-TSA y el p-TSA, que se ionizaron en el modo negativo como $[M + H]^-$, y se utilizaron tres transiciones de MRM para todos los compuestos, excepto para benzotriazol para el cual solo se estudiaron dos iones producto, debido a su estructura y baja masa, se utilizaron cuatro ventanas de tiempo: dos en el modo negativo (0-2,3 min y 4,1 a 7,06 min) y dos en modo positivo (2.3 a 4.1 min y 7,6-20 min).

6.6 Cuantificación

Para la cuantificación de los analitos se propuso una curva de calibración externa, ya que estos analitos suelen estar presentes en las muestras con valores relativamente altos en comparación con la mayoría de los contaminantes emergentes en aguas ambientales. Aunque se trabaja con matrices complejas se descartó la calibración de adición estándar porque aumentaría mucho el tiempo del estudio, y además el efecto matriz se disminuyó con la aplicación de una etapa adicional de lavado en la SPE (apartado 6.5).

Como ya se comentó en apartado 6.2, se preparó una batería de 11 patrones con concentraciones entre 1 y 200ppb en agua ultrapura, a partir de una solución intermedia mixta de 1ppm preparada a partir de otra solución intermedia mixta de 10ppm en metanol proveniente de la disolución de soluciones madre individuales de 1000ppm. Las rectas de calibrado obtenidas se muestran en el anexo 1.

6.7 Estudio económico

Se realizó un estudio económico con la finalidad de calcular los gastos que se han generado con la realización de este proyecto. En dicho estudio económico solo se considerara el coste de reactivos y material desechable, dejando de lado el capital que se ha invertido en la adquisición de la instrumentación y material reutilizable, así como de la infraestructura utilizada, puesto que se considera amortizado.

Antes de realizar la extracción en fase sólida (SPE), las muestras fueron filtradas con filtros de fibra de vidrio de 1,2 μm , el coste de adquisición de este material fue de 30,50€/100unidades, por cada una de las 8 muestras se utilizaron dos filtros, por tanto, el gasto total por el pretratamiento de muestra fue de aproximadamente 5€.

En la tabla 6.4 se resume el coste por extracción de cada uno de los reactivos y materiales utilizados para extracción en fase sólida (SPE), teniendo en cuenta que se utilizaron un total de 40 ml de metanol, 20ml de acetonitrilo, un filtro y una jeringa por cada extracción y se realizaron 24 extracciones, que equivalen a 3 repeticiones por cada una de las 8 muestras. Además se utilizaron un cartucho Oasis HLB y cartucho relleno de 0,5g de Florisil con 2 fritas por cartucho, por cada muestra.

Tabla 6.4 Resumen del coste por extracción de cada uno de los reactivos y materiales utilizados para extracción en fase sólida (SPE)

	Coste de adquisición (€)	Coste por extracción (€)
Reactivo		
Metanol	9,38 ^[a]	0,15
Acetonitrilo	21,78 ^[a]	0,17
Material		
Cartucho Oasis HLB	227,48 ^[b]	2,27
Cartuchos	106,48 ^[b]	1,06
Fritas	107,69 ^[b]	2,15
Florisil	151 ^[c]	0,15
Filtro PTFE 0,22	371,95 ^[d]	7,44
Jeringas	15,61 ^[b]	0,16
Gasto total		235,22€

^[a] Precio por botella de 2,5litros

^[b] Precio por cada 100 unidades

^[c] Precio por cada 500g

^[d] Precio por cada 50 unidades

Por otra parte, en la separación cromatográfica se utilizaron ciertos disolventes para la preparación de la fase móvil, estos disolventes, su precio de adquisición, la cantidad utilizada y el coste total, se resumen en la tabla 6.5.

Tabla 6.5 Resumen de los disolventes utilizados en la preparación de la fase móvil, su precio de adquisición, la cantidad utilizada y el coste total

Disolvente	Precio de adquisición(€)	Cantidad utilizada(ml)	Coste total (€)
Metanol	9,38 ^[a]	2000ml	7,50
Acetonitrilo	21,78 ^[a]	40ml	0,35
Ácido acético	42,1 ^[b]	2ml	0,08
Gasto total			7,94€

^[a] Precio por botella de 2,5litros

^[b] Precio por botella de 1litros

Finalmente en la tabla 6.6 se muestra el gasto total generado en las diferentes etapas del estudio, es importante recordar que este estudio económico no considera los gastos de energías y otros suministros, ni el tratamiento de residuos.

Tabla 6.6 Gasto total generado en las diferentes etapas del estudio.

Etapas	Coste (€)
Tratamiento muestra	5
SPE	235,22
LC-MS/MS	7,9
Total	248,2

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Caracterización fisicoquímica del agua

Para la caracterización de algunas de las propiedades fisicoquímicas del río, se midieron tres parámetros in situ, el pH, la temperatura y la conductividad. Como se mostró previamente en la tabla 6.2, se utilizaron instrumentos digitales y portátiles, facilitados por el *Consorci d'Aigües de Tarragona*.

En primer lugar tenemos la temperatura se observa que los valores obtenidos están por debajo del rango óptimo para el desarrollo normal de las especies acuáticas. Pero se debe tener en cuenta que el muestreo se llevó a cabo en el mes de abril del presente año, en el cual según la agencia estatal de meteorología (AMET) se registró una temperatura media en Cataluña de 11,4°C.^[38] En la figura 7.1 se puede observar que desde el primer punto hasta el último hubo un ligero aumento en las temperaturas, este aumento está asociado a las horas de muestreo, ya que la primera medida se realizó en las primeras horas de la mañana y la última pasado el mediodía. Se obtuvo un valor medio de 16,6°C. Por tal motivo puede considerarse que las variaciones de temperatura registradas en las aguas de esta cuenca pueden estar influenciadas por factores ambientales y no por factores relacionados con la calidad del agua. Un aumento anormal de la temperatura del agua suele estar asociado al vertido de aguas utilizadas en procesos industriales de intercambio de calor.

Temperatura(°C)

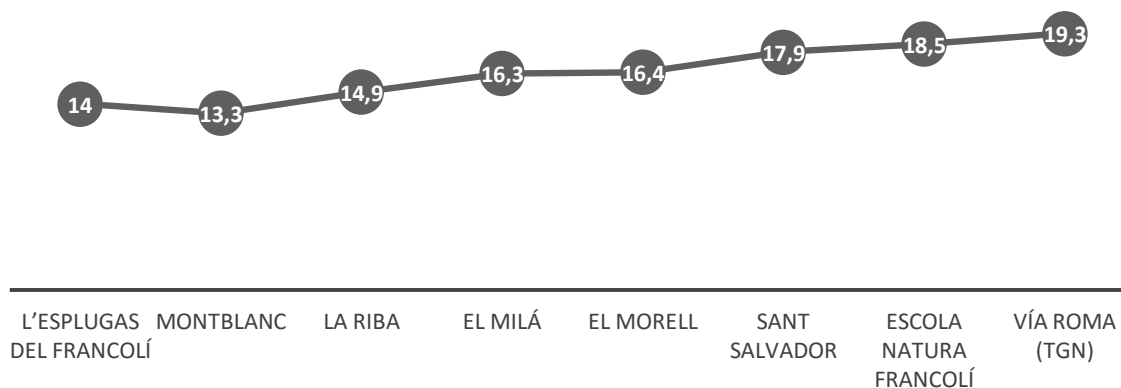


Figura-.7.1 Representación gráfica de las diferentes temperaturas (°C) medidas en los diferentes puntos de muestreo.

En cuanto el pH, teniendo en cuenta que los valores de corte entre la clase de estado bueno/moderado de la IPH^[17], están entre 6 y 9, es decir, entre neutra y ligeramente alcalina, se puede observa en el gráfico que los valores obtenidos fluctúan dentro de los valores óptimos para aguas superficiales no contaminadas, dado a que los datos obtenidos se encuentran entre 8 y 8,8 con un valor medio de 8,4 (figura 7.2), lo que representa un pH con cierto carácter básico asociado a la presencia de carbonatos y bicarbonatos. Cabe destacar que los puntos que muestran un aumento más notable del pH, son los encontrados en las zonas más pobladas y por tanto, los que han sido más modificadas por el hombre. Sin embargo, el hecho de que los valores estén cerca al valor neutro indica que la capacidad amortiguadora del sistema puede mantener los valores de pH naturales.

pH

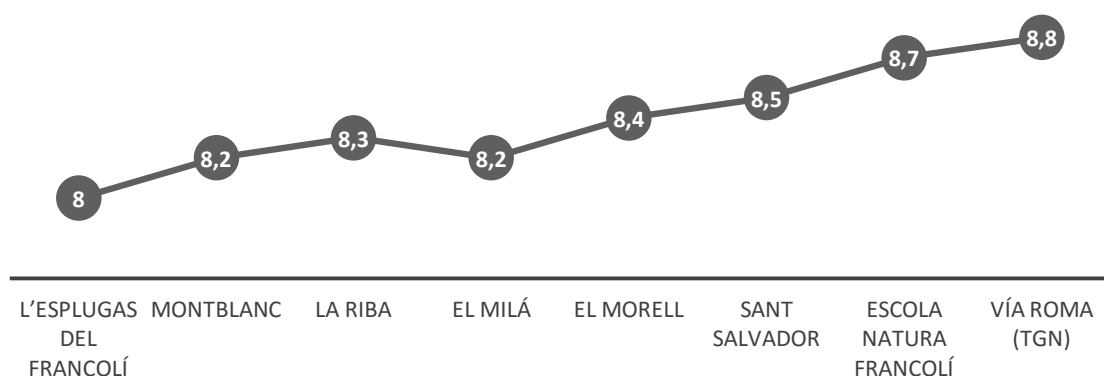


Figura-.7.2 Representación gráfica de los diferentes pH registrados en los diferentes puntos de muestreo.

La conductividad oscila (figura 7.3) entre valores de 653 y 1043 ($\mu\text{S}/\text{cm}$), estos valores se pueden relacionar con el grado de mineralización de las aguas, siendo las sustancias en ella disueltas las que dan al agua la capacidad de conducir la corriente eléctrica. Es decir, en las soluciones acuosas la conductividad es directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos, por lo tanto cuanto mayor sea dicha concentración, mayor será la conductividad. Según lo expuesto en la tabla 44 del Anexo III de la IPH ^[17] (Valores de condiciones de referencia y límites de cambio de clase de estado ecológico de los indicadores de los elementos de calidad de ríos) los valores obtenidos entran en los límites de bueno/moderado en el ecotipo 10 (ríos mediterráneos con influencia cárstica), entre 250 y 1000 ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Los valores que sobrepasan estos límites son los puntos más cercanos a las zonas industrializadas.

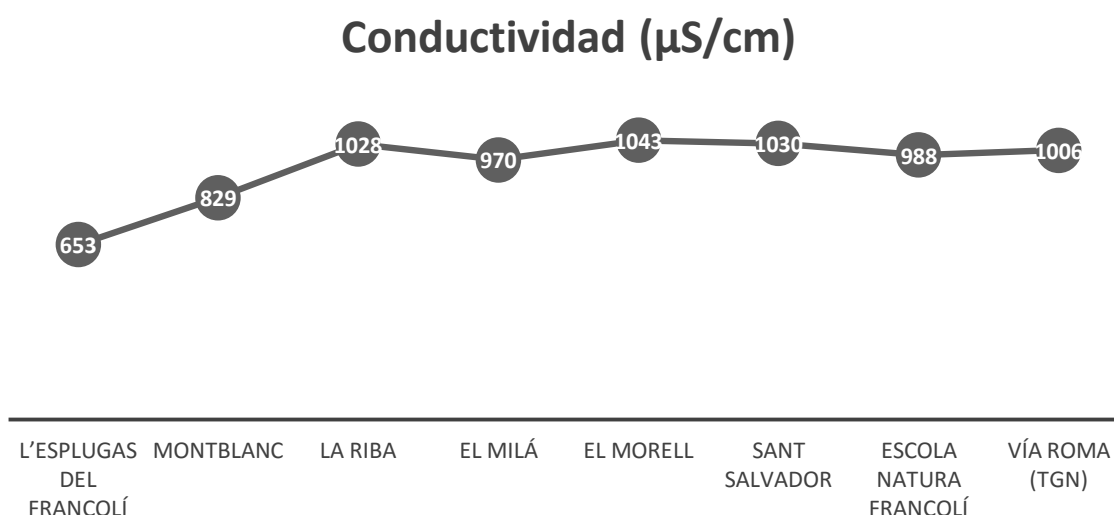


Figura-7.3 Representación gráfica de las diferentes conductividades ($\mu\text{S}/\text{cm}$), medidas en los diferentes puntos de muestreo.

7.2 Parámetros de validación de método analítico

Para determinar los tiempos de retención se utilizó un patrón de una concentración de 200 ppb y se analizó en dos grupos ionizando en modo positivo o negativo dependiendo del rendimiento, en la figura 7.4 se muestra el cromatograma de los iones cuantitativos para los analitos presentes en el patrón estándar y en el anexo 2 se muestra la intensidad relativa y el tiempo de retención de cada uno de los analitos por separados, se puede observar que la separación duró menos de 15 min y que en general los analitos quedaron bien separados, a excepción de los dos pares de isómeros, o-TSA/p-TSA y 4TTR/5TTR, cuyos picos quedaron parcialmente y totalmente solapados, respectivamente. Los tiempos de retención obtenidos se muestran en la tabla 7.1

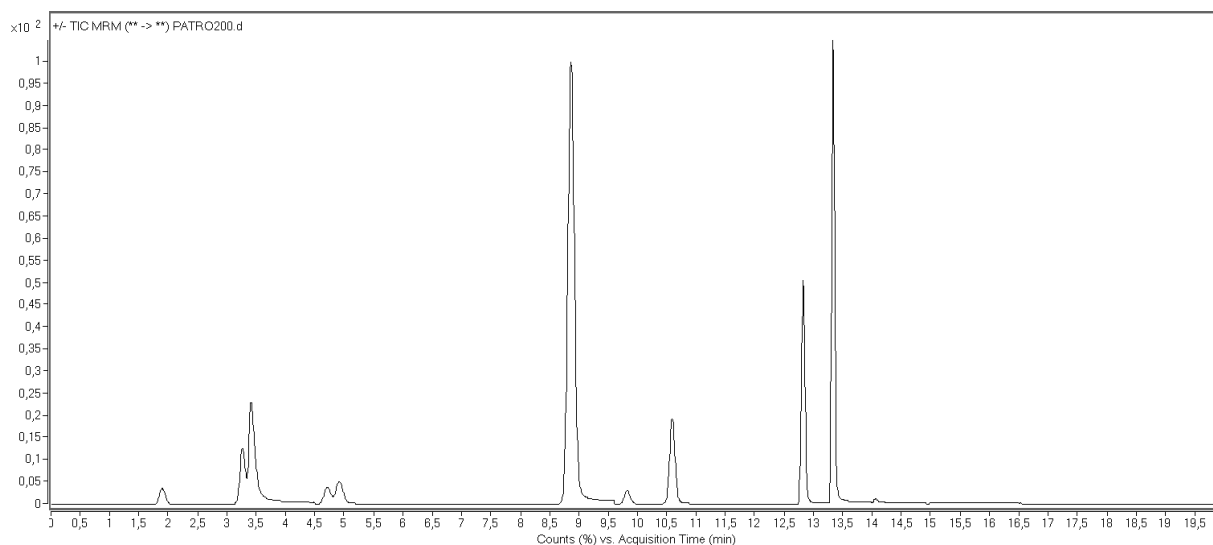


Figura-. 7.4 Cromatograma MRM para una solución estándar de analitos diana (200ppb)

La linealidad, límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) mostrados en la tabla 7.1, se calcularon a partir de rectas de calibrado externo realizadas a partir de patrones con concentraciones entre 1 y 200ppb. Se utilizaron valores de recuperación de un estudio previo, los cuales se obtuvieron a partir de muestras de ríos a las que se le añadió una concentración conocida de los respectivos analitos. Los LOQ se calcularon como el punto más bajo de la curva de calibrado y este punto equivale también al punto mínimo del intervalo de linealidad, para la determinación del punto máximo de dicho intervalo solo se utilizó el parámetro r^2 de la recta (que se muestra en el anexo 1 junto a las rectas utilizadas) ya que los cromatogramas mostraban muy poco ruido por lo que no se pudo hacer a partir de la relación señal / ruido.

Tabla 7.1 Tiempo de retención (t_R), límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD), límite superior del intervalo de linealidad (LD) y recuperaciones de los analitos estudiados.

Compuesto	t_R (min)	LOD (ppb)	LOQ(ppb)	LD (ppb)
BSA	1,89	2.5	5	80
BTR	3,35	2.5	10	200
NH ₂ BT	3,45	2.5	10	200
p-TSA	4,7	2.5	10	100
o-TSA	5,01	2.5	10	200
4TTR/5TTR	8,9	1	10	200
OHBT	9,8	2.5	10	200
CIBTR	10,6	1	10	200
XTR	12,8	1	2.5	50
Et-p-TSA	13,33	1	2.5	50
MeSBT	14,06	10	10	200

7.3 Cuantificación de los analitos

Una vez estudiada la posibilidad de aplicar el método en muestras ambientales, se procedió a determinar los diferentes analitos de interés en las ocho muestras del río Francolí, las concentraciones registradas son producto de la media de tres repeticiones diferentes de un mismo punto de muestreo, la presencia de estos analitos se detectó en base a la transición de cuantificación y se confirmó con algunas de las transiciones secundarias más estables.

La tabla 7.2 muestra que todos los compuestos fueron detectados en al menos un punto de muestreo, con la excepción de MeSBT que no se detectó en ninguna de las muestras. Por otra parte, el BSA, NH₂BT, o-TSA, CIBTR, XTR, Et-p-TSA, aunque fueron detectados en varias de las muestras, no se cuantificaron en ninguna, debido a que su concentración no sobrepasaba el límite de cuantificación. Los isómeros 4TTR/5TTR se calcularon de forma conjunta, ya que no se consiguió una separación de los picos cromatográficos. En general, las concentraciones más elevadas se hallaron en los puntos del Morell (E) y la Escola Natura Francolí (G), pero el punto de Montblanc (B) mostro un concentración de BTR tres veces mayor que el resto de los puntos de muestreo. También se observa que en el punto de muestreo de l'Espluga de Francolí (A) no se cuantificó ninguno de los analitos. Los puntos en los que se cuantificó una mayor cantidad total de estos contaminantes fueron Montblanc (B), la Masó (D) y el punto de la Escola Natura Francolí (G), siendo el B y el D puntos cercanos a zonas con alta actividad industrial, y G un punto importante en este estudio ya que es la zona custodiada por *Mare-Terra Fundació Mediterrànea*. En general la concentración de estos analitos es muy dependiente de las fuentes de emisión, se puede decir, que las concentraciones encontradas son bajas en comparación a otros estudios que determinan estos analitos en muestras de diferentes ríos tanto de la comunidad autónoma como del país en general.

Tabla 7.2 Concentraciones encontradas (en ppb) de los analitos de interés en los diferentes puntos de muestreo.

Compuestos	[Muestras]ppb							
	A	B	C	D	E	F	G	H
BSA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.017	<LOQ	<LOQ	0.007	<LOQ
BTR	<LOQ	0.34	0.06	0.11	0.08	0.10	0.11	0.08
NH ₂ BT	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ
p-TSA	n.d	0.03	<LOQ	0.10	0.03	0.05	0.07	0.05
o-TSA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4TTR/5TTR	<LOQ	0.07	0.03	0.17	0.07	0.08	0.14	0.11
OHBT	<LOQ	0.04	0.05	0.15	<LOQ	0.06	0.16	0.07
CIBTR	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d
XTR	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d
Et-p-TSA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
MeSBT	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Total	-	0.48	0.14	0.55	0.18	0.29	0.49	0.31

<LOQ inferior al límite de cuantificación

n.d no detectado

8. CONCLUSIONES

The study of the different physicochemical properties showed that there is some relationship between water quality and human activity in the different sampling points, although the values obtained are within the limits of good / moderate set in IPH.

As for the determination of different sample compounds, all compounds quantized at lower concentrations of 1 ppb, and also showed a certain relation to the proximity of the sampling points to the most industrialized areas. The method used was shown to be suitable for the determination of these analytes in samples of river water, but have difficulty separating isomers.

9. REFERENCIAS

1. Mare-Terra Fundació Mediterrània. <http://www.mare-terra.org/es/quienes-somos.html> (Fecha de consulta: 8 de Abril del 2016)
2. USGS. The World's Water. <http://water.usgs.gov/edu/earthwherewater.html> (Fecha de consulta 20 de abril del 2016)
3. Pesce, S.F; Wunderlin, D. Use of water quality indices to verify the impact of Cordoba city (Argentina) on Suquía river. *Water Research*. **2000**, 34(11), 2915–2926.
4. Raj, P; Lee, S; Lee Y; Raj, S; Pratap, S. Application of Water Quality Indices and Dissolved Oxygen as Indicators for River Water Classification and Urban Impact Assessment. *Environ Monit Assess*. **2007**, 132, 93–110. DOI 10.1007/s10661-006-9505-1
5. Roig, N; Sierra, J; Ortiz, J; Merseburger, G; Schuhmacher, M; Domingo, J; Nadal, M. Integrated study of metal behavior in Mediterranean stream ecosystems: A case-study. *J.Hazard.Mater*. **2013**, 263, 122-130.
6. Mestres, M; Sierra, J:P; Möso, C; Sánchez-Arcilla, A. Sources of contamination and modelled pollutant trajectories in a Mediterranean harbour (Tarragona, Spain). *Marine Pollution Bulletin*. **2010**, 60, 898–907.
7. Ortiz, J. *La vida al riu Francolí: Els humans i els sistemes aquàtics*, 1^{era} edició; Publicacions URV: Tarragona, 2014; 19-171.
8. López, T. *El Francolí un corrent de vida*, 1^{era} edició; Silva Editorial: Tarragona, 2009; 121-128.
9. Herrero, P; Borrull, F; Pocurull, E; Marcé R.M. Efficient tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method to determine polar benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide contaminants in environmental water samples. *J.Chromatogr.,A.* **2013**, 1309, 22–32.
10. Herrero, P; Borrull, F; Marcé, R.M; Pocurull E. A pressurised hot water extraction and liquid chromatography–high resolution mass spectrometry method to determine polar benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. *J.Chromatogr.,A.* **2014**, 1355, 53-60.
11. Domínguez, C; Reyes-Contreras, C; Bayona, J.M. Determination of benzothiazoles and benzotriazoles by using ionic liquid stationary phases in gas chromatography mass

- spectrometry. Application to their characterization in wastewaters. *J.Chromatogr.,A.* **2012**, 1230, 117-122.
12. Loi, C; Buseti, F; Jinge, K; Joll, C. Development of a solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for benzotriazoles and benzothiazoles in wastewater and recycled water. *J.Chromatogr.,A.* **2013**, 1299, 48-57.
 13. Naccarato, A; Gionfriddo, E; Sindona, G; Tagarelli, A. Simultaneous determination of benzothiazoles, benzotriazoles and benzosulfonamides by solid phase microextraction gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry in environmental aqueous matrices and human urine. *J.Chromatogr.,A.* **2014**, 1338, 164-173.
 14. Pena, M.T; Vecino-Bello, X; Casais, M. C; Mejuto, M. C; Cela, R. Optimization of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of benzotriazoles and benzothiazoles in water samples. *Anal Bioanal Chem.* **2012**, 402,1679–1695. DOI 10.1007/s00216-011-5598-7
 15. Salas, D; Borrull, F; Marcé, R.M; Fontanals, N. Study of the retention of benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in mixed-mode solid-phase extraction in environmental samples. *J.Chromatogr.,A.* **2016**, 1444, 21-31.
 16. Carpinteiro, I; Abuin, B; Ramil, M; Rodríguez, I; Cela, R. Simultaneous determination of benzotriazole and benzothiazole derivatives in aqueous matrices by mixed-mode solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **2012**, 402, 2471–2478. DOI 10.1007/s00216-012-5718.
 17. ORDEN ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción de planificación hidrológica.
 18. Directiva 2000/60/EC del Parlamento Europeo y el Consejo de Europa del 23 de octubre de 2000 establece una marco comunitario de acción en el ámbito de la política de aguas.
 19. Directiva 2008/105/CE relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan las Directivas 82/176/CEE, 8/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modificad la Directiva 2000/60/CE.
 20. Stolp, H. Microbial Ecology: Organisms, Habitats, Activities. Cambridge University Press. 1998. Pp129-144
 21. Prasain, J. K. Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. En Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles. Amorim Madeira, P.J; Florêncio, H. InTech: Croacia, 2012, 3-9.
 22. Ekman, R; Silberring, J; Westman-Brinkmalm, A.M; Kraj; A. A mass spectrometer's building blocks. En *Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications*. Desiderio, D; Nibbering, N. Wiley: New Jersey, 2009; pp 15- 65.
 23. Ekman, R; Silberring, J; Westman-Brinkmalm, A.M; Kraj; A. Tandem mass spectrometry. En *Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications*. Desiderio, D; Nibbering, N. Wiley: New Jersey, 2009; pp 89.
 24. Fernández-Lainez, C; Vela-Amieva, M; Ibarra-González, I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex.* **2009**, 30, 258-63.

25. Hoffmann, E. Special Feature: tutorial. Tandem Mass Spectrometry: a Primer. *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 129-137.
26. INSHT. Fichas internacionales de seguridad química. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0057.pdf> (Fecha de consulta: 10 de Mayo del 2016)
27. INSHT. Fichas internacionales de seguridad química. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0088.pdf> (Fecha de consulta: 10 de Mayo del 2016)
28. INSHT. Fichas internacionales de seguridad química. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/301a400/nspn0363.pdf> (Fecha de consulta: 10 de Mayo del 2016)
29. Ajuntament de l'Espluga de Francolí. El pueblo. <http://www.esplugadefrancoli.cat/municipi/index.php> (Fecha de consulta: 10 de Mayo del 2016)
30. Idescat. Anuario estadístico de Cataluña. Altitud, superficie y población. 2015. Municipios. <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=925&lang=es> (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016)
31. Ajuntament de Monblanc. Coneix Monblanc. <http://www.montblanc.cat/lavila/coneix> (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016).
32. Ajuntament de La Riba. Alt Camp. Xarxa Ciutadana. <http://www.riba.altanet.org/niv2.php?id=15>. (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016).
33. Ajuntament de La Masó. <http://www.maso.altanet.org/historia-0>. (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016).
34. Ajuntament del Morell. <http://www.morell.cat/municipi/index.php> (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016).
35. Ajuntament de Tarragona. <http://www.tarragona.cat/la-ciutat/coneix-tarragona> (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016).
36. Agència Catalana de l'Aigua (ACA). Generalitat de Catalunya. Depuradores en servei. http://acaweb.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P1225554461208201540084. (Fecha de consulta: 6 de Abril del 2016).
37. Waters. The science of what's possible. Productos Oasis para extracción de muestras. http://www.waters.com/waters/es_PE/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=es_PE (Fecha de consulta: 15 de Mayo del 2016)
38. Stashenko, E; Martínez, J. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué? *Scientia Chromatographica* Vol.2, **2010**, 4, 25-48.
39. Gobierno de España. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. AEMet. Avance Climatológico mensual en Cataluña. http://www.aemet.es/documentos/es/serviciosclimaticos/vigilancia_clima/resumenes_climat/ccaa. Fecha de consulta: 19 de Mayo del 2016)

10. ANEXOS

Anexo 1-. Rectas de calibrado de cada uno de los compuestos

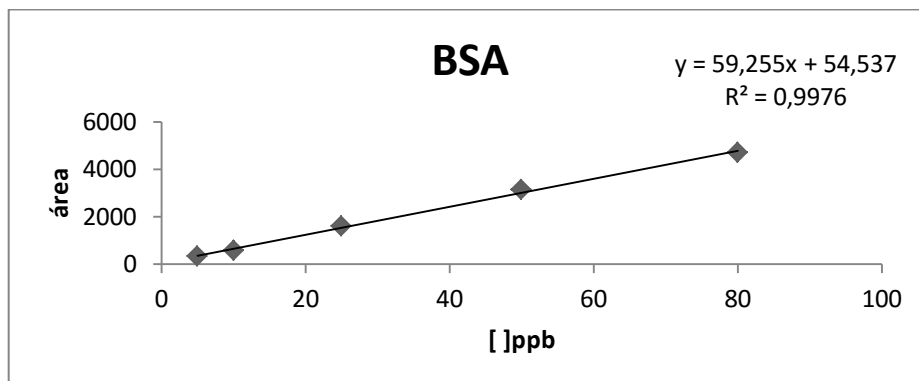


Figura-.11.1 Recta de calibrado para el BSA.

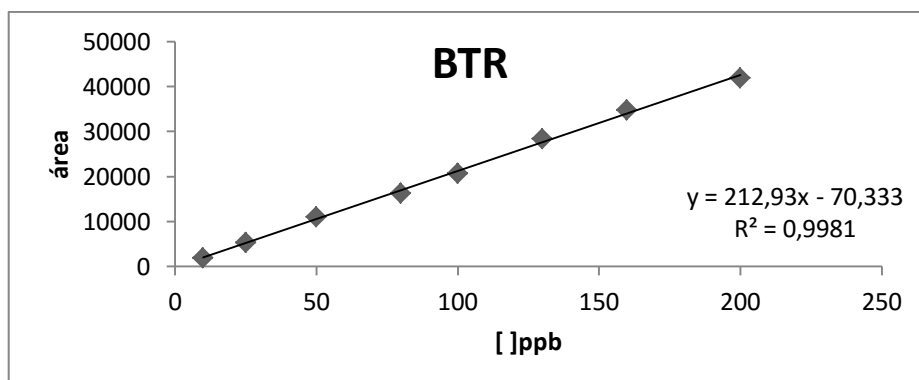


Figura-.11.2 Recta de calibrado para el BTR.

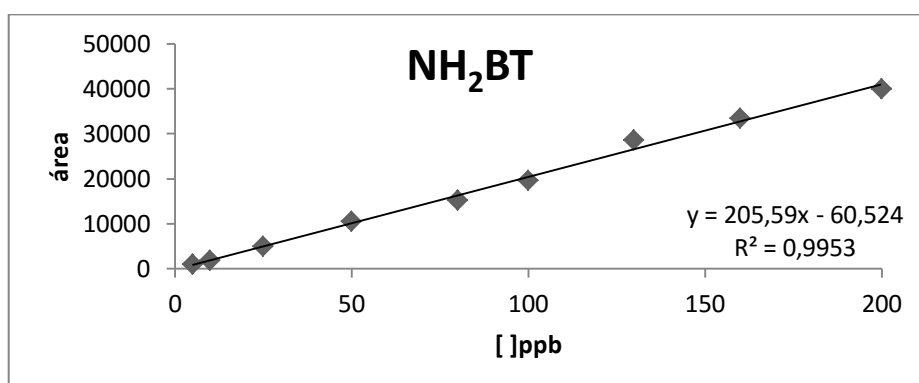


Figura-.11.3 Recta de calibrado para el NH₂BT.

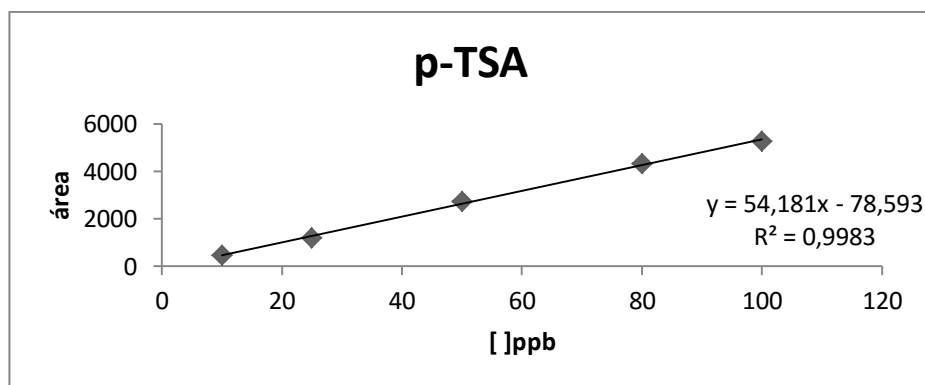


Figura-.11.4 Recta de calibrado para el p-TSA.

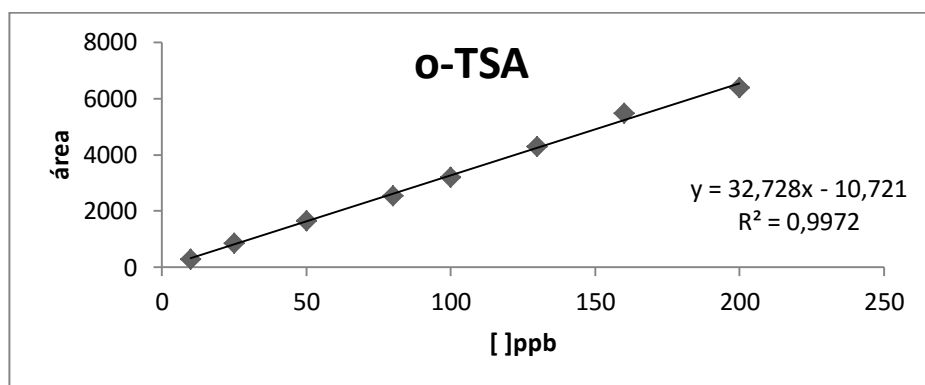


Figura-.11.5 Recta de calibrado para el o-TSA.

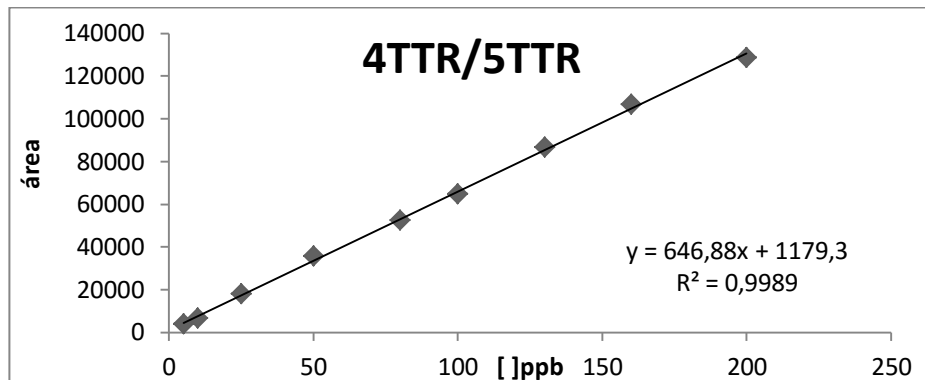


Figura-.11.6 Recta de calibrado para el 4TTR y el 5TTR, isómeros que no se pudieron separar.

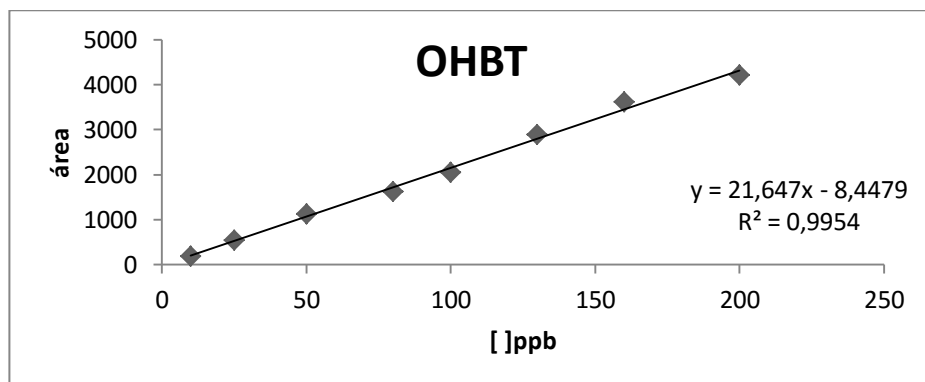


Figura-.11.7 Recta de calibrado para el OHBT.

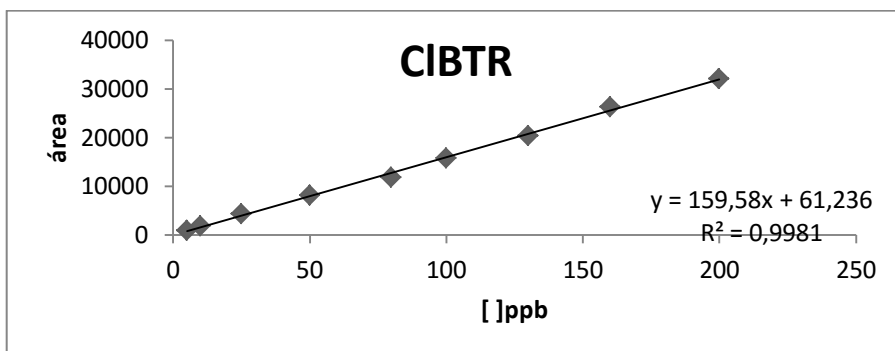


Figura-.11.8 Recta de calibrado para el CIBTR.

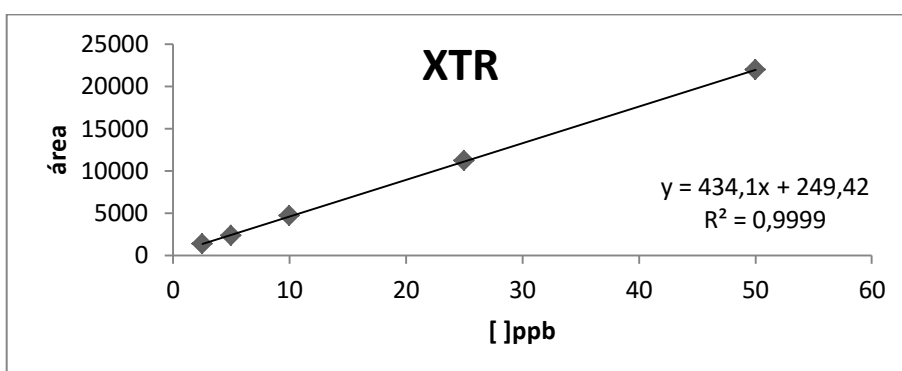


Figura-.11.9 Recta de calibrado para el XTR.

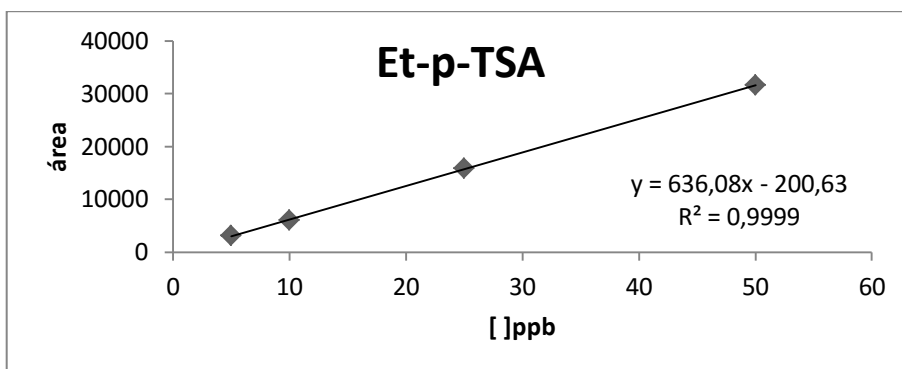


Figura-.11.10 Recta de calibrado para el Et-p-TSA.

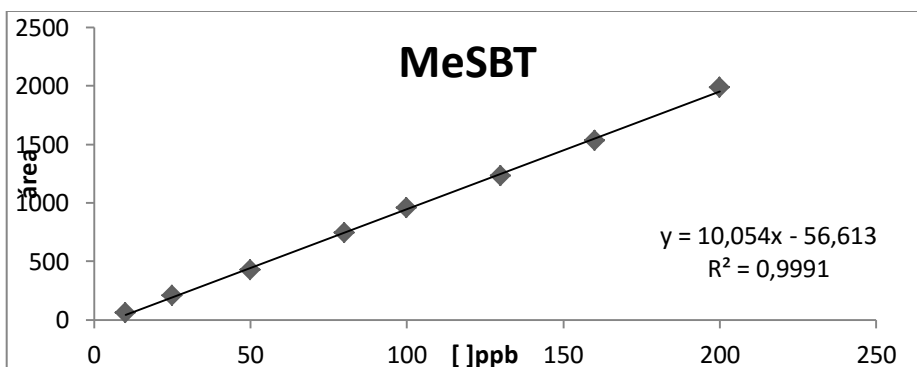


Figura-.11.11 Recta de calibrado para el MeSBT.

Anexos 2-. Cromatogramas de los iones cuantitativos de todos los analitos estudiados

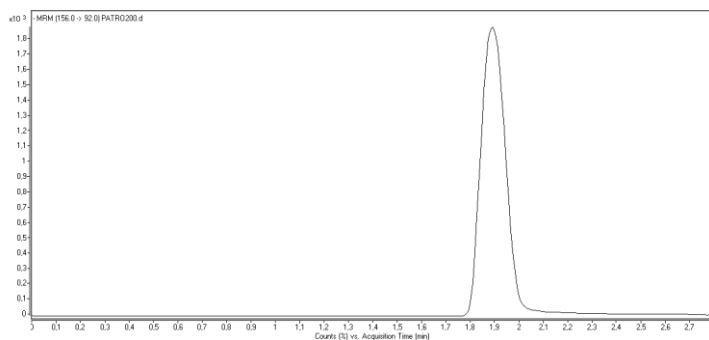


Figura-.11.12 Cromatograma del ion cuantitativo del BSA ($t_R=1.89\text{min}$).

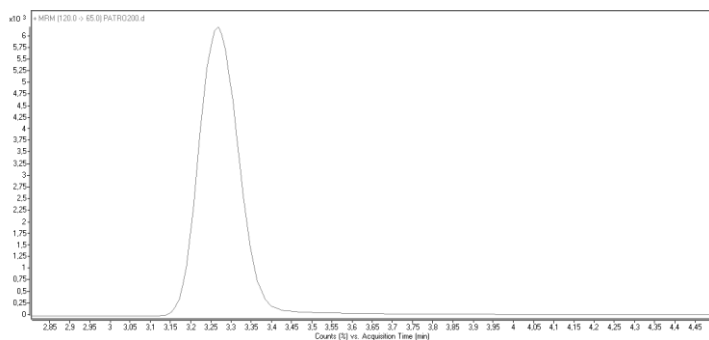


Figura-.11.13 Cromatograma del ion cuantitativo del BTR ($t_R=3.35\text{min}$).

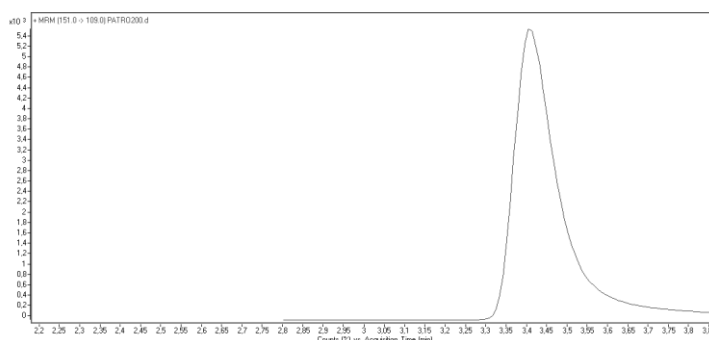


Figura-.11.14 Cromatograma del ion cuantitativo del NH_2BT ($t_R=3.4\text{min}$).

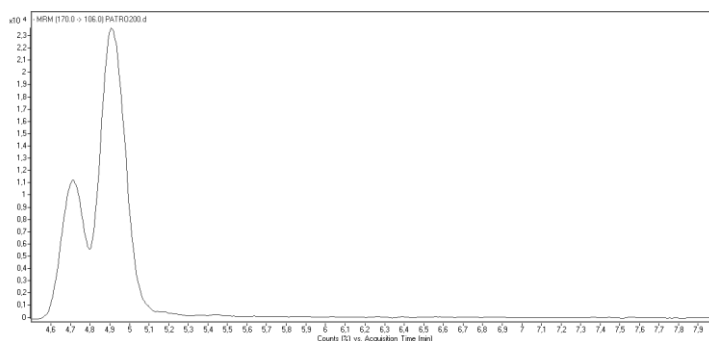


Figura-.11.14 Cromatograma del ion cuantitativo del p-TSA ($t_R=4.9\text{min}$).

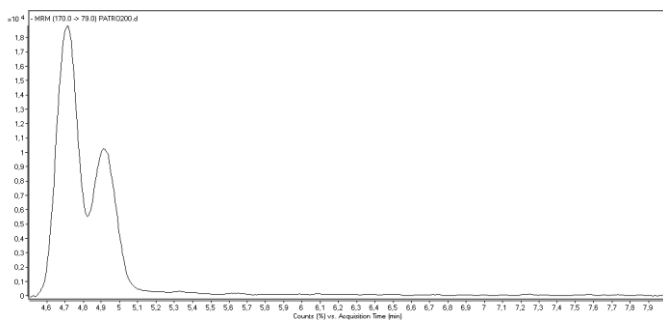


Figura-.11.15 Cromatograma del ion cuantitativo del o-TSA ($t_R=4.7\text{min}$).

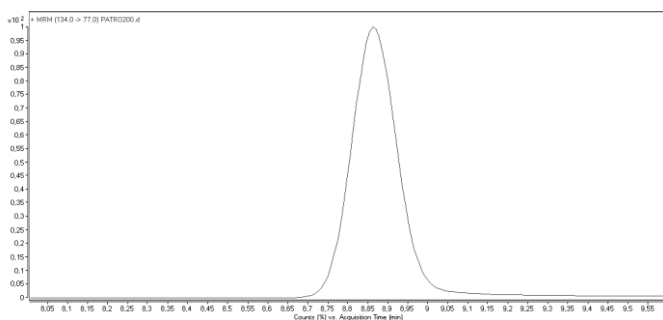


Figura-.11.16 Cromatograma del ion cuantitativo del 4TTR/5TTR ($t_R=8.86\text{min}$).

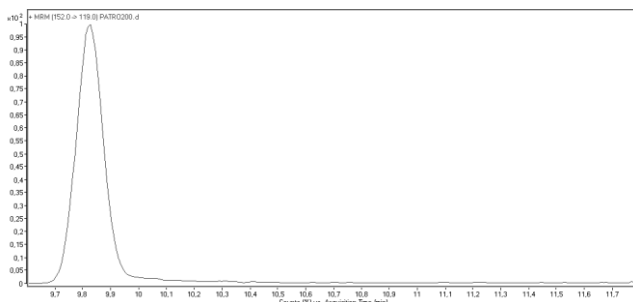


Figura-.11.17 Cromatograma del ion cuantitativo del OHBT ($t_R=9.8\text{min}$).

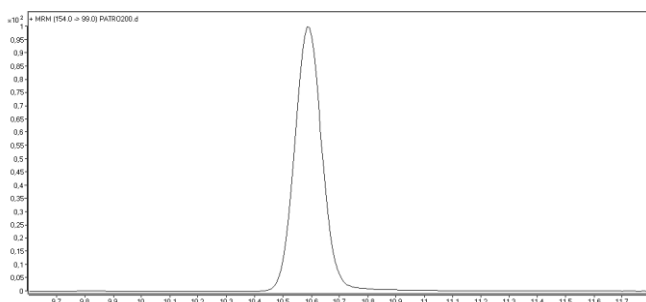


Figura-.11.18 Cromatograma del ion cuantitativo del CIBTR ($t_R=10.58\text{min}$).

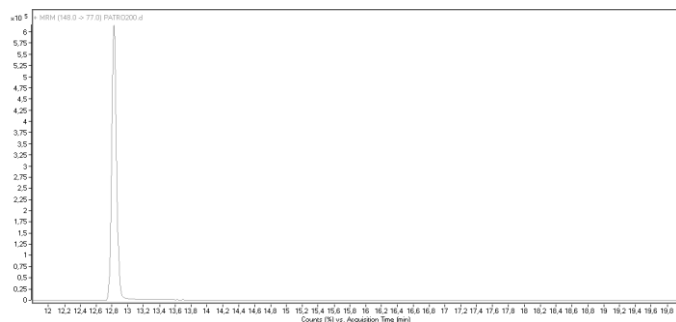


Figura-.11.19 Cromatograma del ion cuantitativo del XRT ($t_R=12.82\text{min}$).

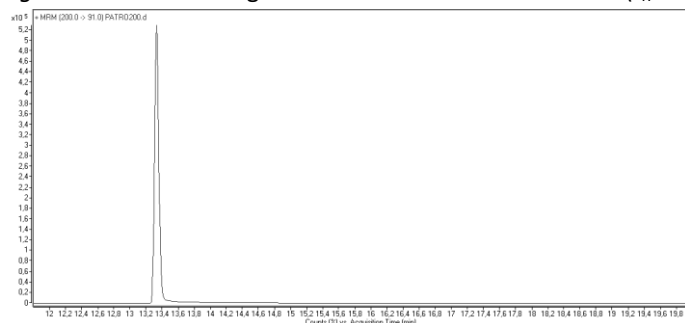


Figura-.11.20 Cromatograma del ion cuantitativo del Et-p-TSA ($t_R=13.33\text{min}$).

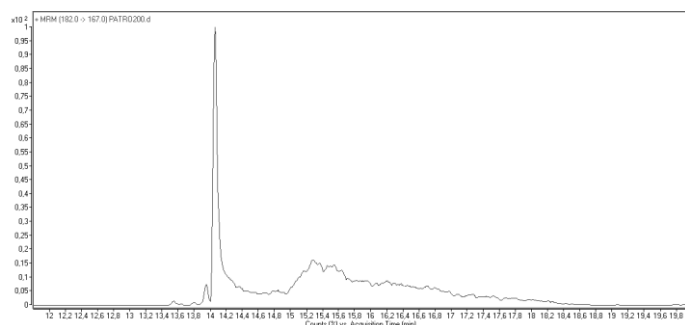


Figura-.11.21 Cromatograma del ion cuantitativo del MeSBT ($t_R=14.06\text{min}$).

Anexo 3-. Cromatograma MRMs para las muestras en los diferentes puntos

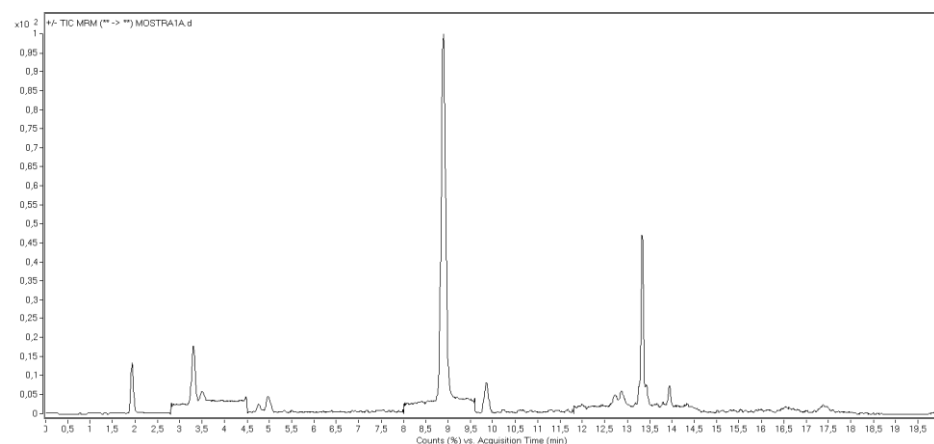


Figura-.11.22 Cromatograma MRM para una muestra de l'Espluga de Francolí (A)

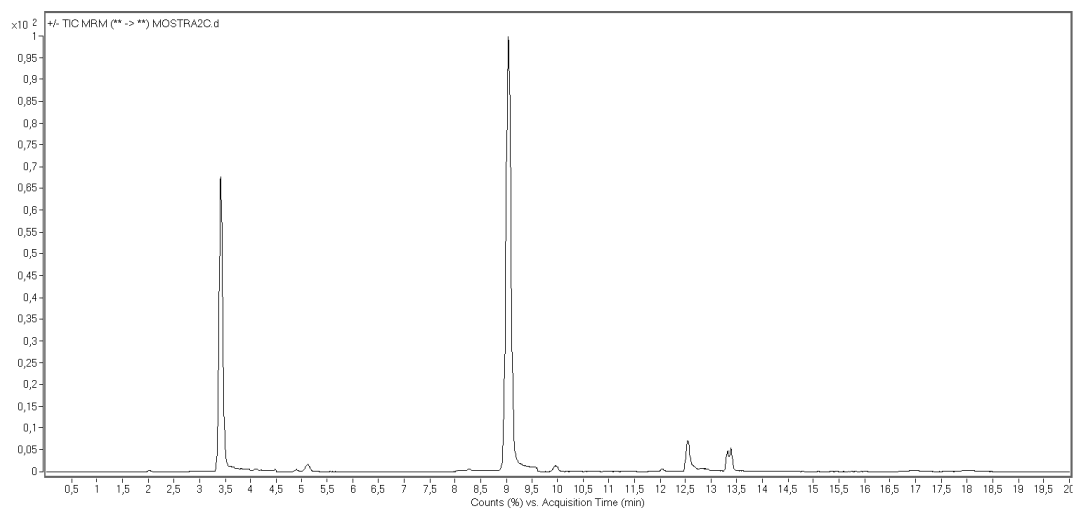


Figura-.11.23 Cromatograma MRM para una muestra de Montblanc (B)

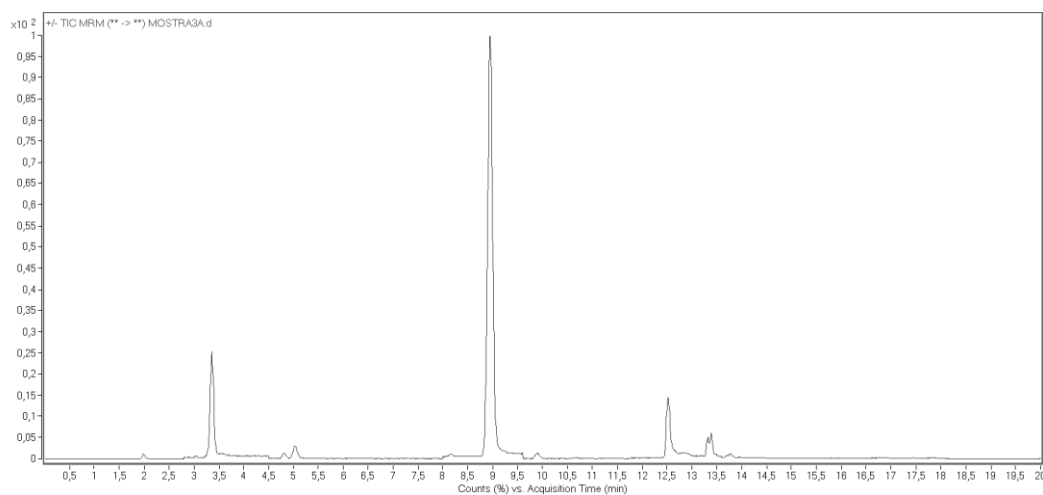


Figura-.11.24 Cromatograma MRM para una muestra de la Riba (C)

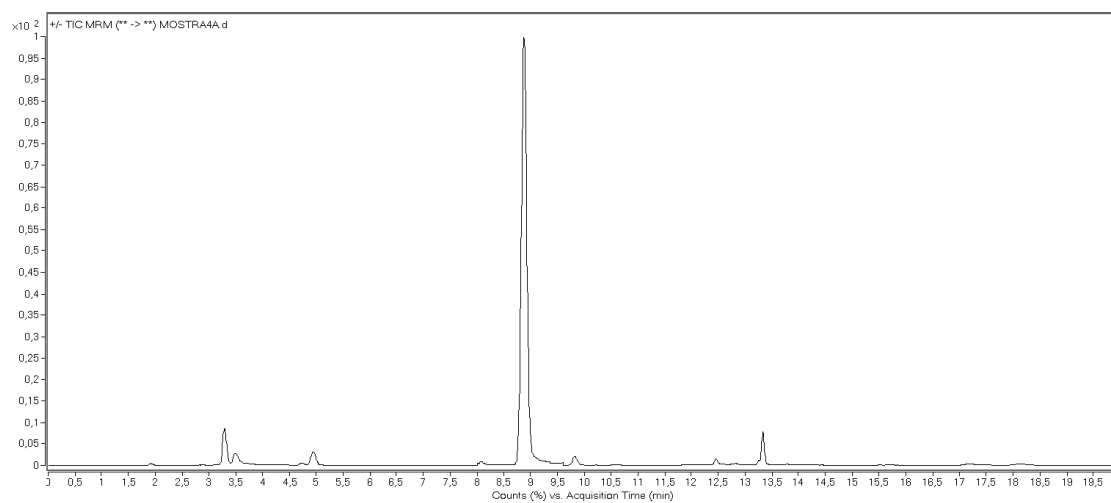


Figura-.11.25 Cromatograma MRM para una muestra de la Masó (D)

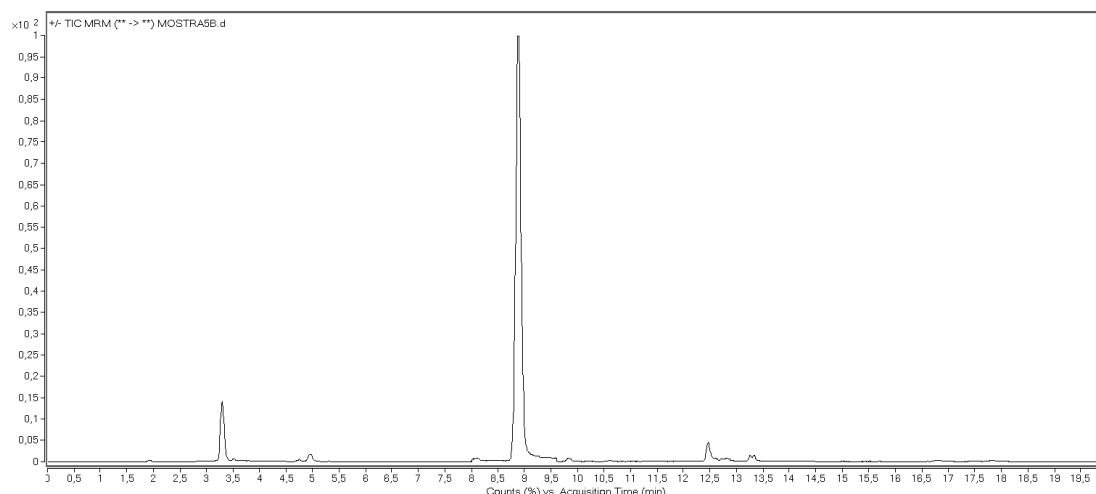


Figura-.11.26 Cromatograma MRM para una muestra de El Morell (E)

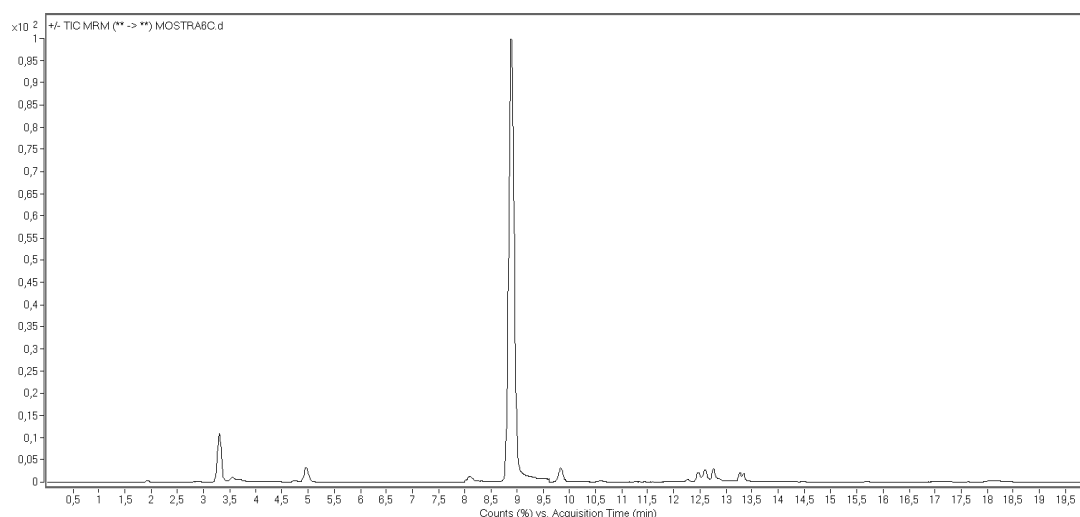


Figura-.11.27 Cromatograma obtenido a partir de la muestra de Sant Salvador, Tarragona (F)

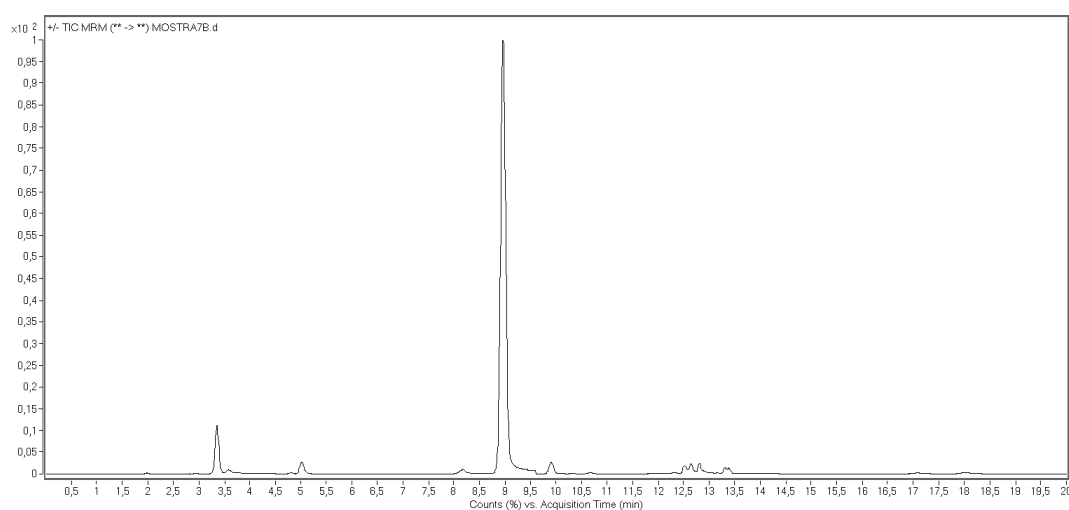


Figura-.11.28 Cromatograma MRM para una muestra de Escola Natura de Francolí (G)

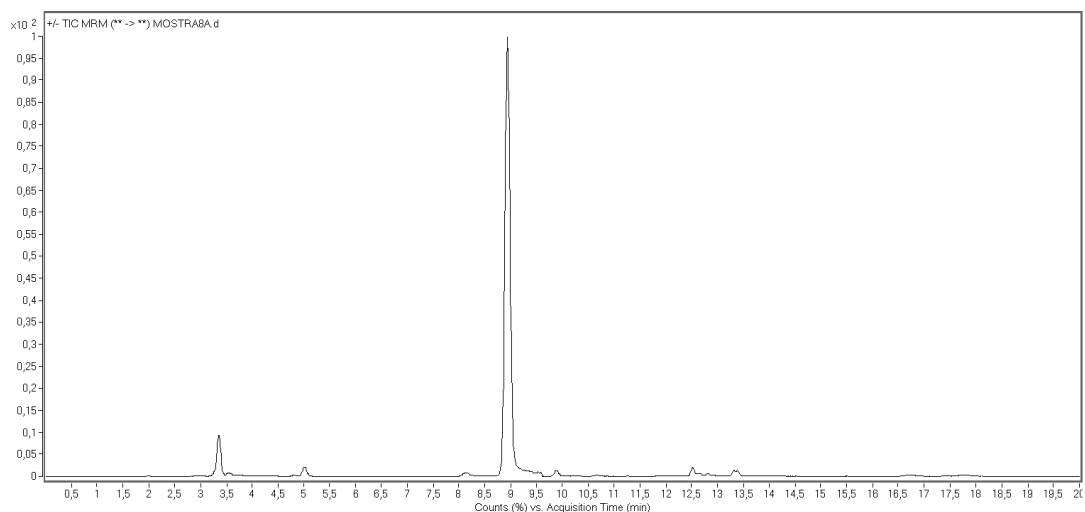


Figura-.11.29 Cromatograma MRM para una muestra de vía Roma, Tarragona (H)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres, Dr. Noel Vera y Dra. Carmen Arreaza, por inculcarme la importancia de tener una formación académica, motivarme cada día y creer en mí en todo momento.

A los miembros del grupo de investigación de Cromatografía, Aplicaciones Medioambientales (CROMA) por permitirme la realización de este estudio, haciendo una mención especial a Mireia Núñez por utilizar su tiempo en facilitarme la información necesaria para la utilización del instrumento y por su colaboración en general en la realización de este estudio.

A mis tutores, Francesc Borrull, Eva Pocurull y Soraya Uroz, por colaboración y por su trato cortés en todo momento.