

## COMPUESTOS PERFLUORADOS EN EQUINODERMOS MARINOS: METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA SU DETERMINACIÓN Y MONITORIZACIÓN

Martín, Julia<sup>1</sup>; Santos, Juan Luis<sup>1</sup>; Aparicio, Irene<sup>1</sup>; Alonso, Esteban<sup>1</sup>; Zafra-Gómez, Alberto<sup>2</sup>; Vílchez, José Luis<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Análisis Químico Industrial y Medioambiental (FQM-344). Departamento de Química Analítica. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

<sup>2</sup>Química Analítica y Ciencias de la Vida (FQM-338). Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

### RESUMEN

Los disruptores endocrinos están en el punto de mira de estudios ambientales y ecotoxicológicos. Entre ellos destacan los compuestos perfluorados, tanto por su amplio uso industrial y doméstico como por su elevada actividad estrogénica. Se descargan al medio ambiente a través de efluentes industriales y de estaciones depuradoras de aguas residuales afectando principalmente a la biota donde pueden bioacumularse.

En este trabajo se propone un método analítico para la determinación de seis compuestos perfluorados en organismos marinos (*Holothuria tubulosa*) y se lleva a cabo un programa de monitorización ambiental para el seguimiento de estos compuestos.

El análisis de las muestras se realizó mediante extracción con disolventes, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas en tándem. Las recuperaciones obtenidas se situaron en el rango de 84 a 101 % y límites de cuantificación inferior a 0,03 ng/g (peso seco (ps)).

Todas las muestras dieron positivas en el análisis de los contaminantes con concentraciones entre 667 ng/g (ps) para el ácido perfluorooctanoico y 0,81 ng/g (ps) para el ácido perfluoropentanoico. Además, se observaron concentraciones más elevadas para los compuestos perfluorados de mayor cadena fluorocarbonada.

**Palabras clave:** *Disruptores endocrinos, Compuestos perfluorados, Holothuria tubulosa, Metodología analítica, Monitorización.*

### ABSTRACT

In recent years endocrine disruptors have come into the spotlight of environmental and ecotoxicological studies. Among them, perfluorinated compounds stand out, both, for their wide industrial and domestic use and for their elevated estrogenic activity, showing adverse effects at trace level. They are released into the environment through industrial waste and wastewater discharges affecting to marine organisms, where they can accumulate.

To contribute to this goal, this work proposes an analytical method for the simultaneous determination of six perfluorinated compounds in marine organisms (*Holothuria tubulosa*) and an environmental monitoring program is carried out in these organisms.

The sample treatment involve steps of solvent extraction and clean-up of the extracts with dispersive sorbents prior to liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. Recoveries between 84 and 101 %, precision (RSD < 9 %) and limits of quantification below 0.03 ng/g dry weight (d.w.) were achieved.

All tested samples were positive in the analysis of contaminants with concentrations between 667 ng/g (dw) for perfluorooctanoic acid (PFOA) and 0.81 ng/g (dw) for perfluoropentanoic acid (PFPeA). In

general, perfluorinated compounds of larger fluorocarbonated chain were quantified at higher concentration levels than those of shorter one.

**Keywords:** *Endocrine disruptors, perfluorinated compounds, Holothuria tubulosa, Analytical methodology, Monitoring program.*

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Cuanta más capacidad tenemos de analizar el mundo que nos rodea, apreciamos mucho mejor nuestra huella en él. El desarrollo y avance de nuestra sociedad ha traído consigo nuevos problemas de contaminación ambiental como es el caso de los contaminantes emergentes, sustancias previamente desconocidas o no reconocidas como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Dentro de este grupo de compuestos se engloban un gran número de sustancias utilizadas en el ámbito industrial y doméstico como productos de higiene personal, aditivos de plásticos, detergentes, pesticidas, etc (Kiyama y Wada-kiyama, 2015).

En este trabajo nos centramos en el grupo de los compuestos perfluorados (PFCs, perfluoroalkyl compounds). El enlace flúor-carbono tiene una profunda influencia sobre las propiedades físicas y químicas, aumentando extremadamente la estabilidad química y térmica de estos compuestos haciéndolos más hidrofóbicos, oleofóbicos y tensioactivos. No son compuestos combustibles, resisten adecuadamente a la acción de ácidos fuertes o compuestos con pH básico, además de ser agentes oxidantes y propensos a la fotólisis. Todas estas propiedades han facilitado su utilización desde los años 50 en numerosas aplicaciones industriales y comerciales, empleándose como repelentes de aguas, grasas y aceites en tableros y productos de papel; pinturas, adhesivos y productos de limpieza e higiene personal; también se han utilizado como protectores superficiales antimanchas de alfombras y materiales textiles; antiadherentes en utensilios de cocina; materiales empleados en la fabricación de semiconductores, fluidos hidráulicos para aviación, espumas contra incendios, insecticidas, herbicidas y materiales de uso médico y odontológico.

Los compuestos perfluorados (PFC) han captado recientemente la atención de la comunidad científica debido a las características de persistencia, bioacumulación y toxicidad que presentan (Armstrong y cols., 2016). Se han catalogado como contaminantes hormonales o EDCs porque son capaces tanto de mimetizar como de inhibir, la acción natural de las hormonas, provocando efectos adversos a bajas concentraciones principalmente en el desarrollo de los individuos y en su capacidad reproductiva (Benigni y cols., 2017). Estudios con animales han detectado efectos en el hígado, el sistema inmune, el desarrollo y los órganos sexuales, entre otras cosas.

Hoy día se producen miles de toneladas de PFCs al año que se descargan al medio ambiente por emisión directa o a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales, donde no se eliminan totalmente. Aunque el agua es el compartimento ambiental más afectado, estos contaminantes pueden adsorberse a sedimentos y bioacumularse en organismos (Figura 1).

La escasez de estudios relativos a este tipo de contaminantes hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su determinación en una amplia variedad de muestras bióticas y abióticas, para conseguir caracterizar su comportamiento y distribución global en el medio ambiente, así como para evaluar la toxicidad que provocan en los seres vivos (Martín y cols., 2017; Rahman Kabir y cols., 2015).

Para contribuir a este fin, en este trabajo se propone un método analítico para la determinación simultánea de seis compuestos perfluorados en organismos marinos (*Holothuria tubulosa*) y se lleva a cabo un programa de monitorización ambiental para el seguimiento de estos compuestos en organismos procedentes de la costa Granadina. La selección de los PFCs (ver Tabla 1) se llevó a cabo conforme a la información encontrada en la literatura, atendiendo a su consumo, su comportamiento durante el tratamiento de aguas residuales, su persistencia en los procesos convencionales de depuración y las concentraciones encontradas en diversas matrices medioambientales.

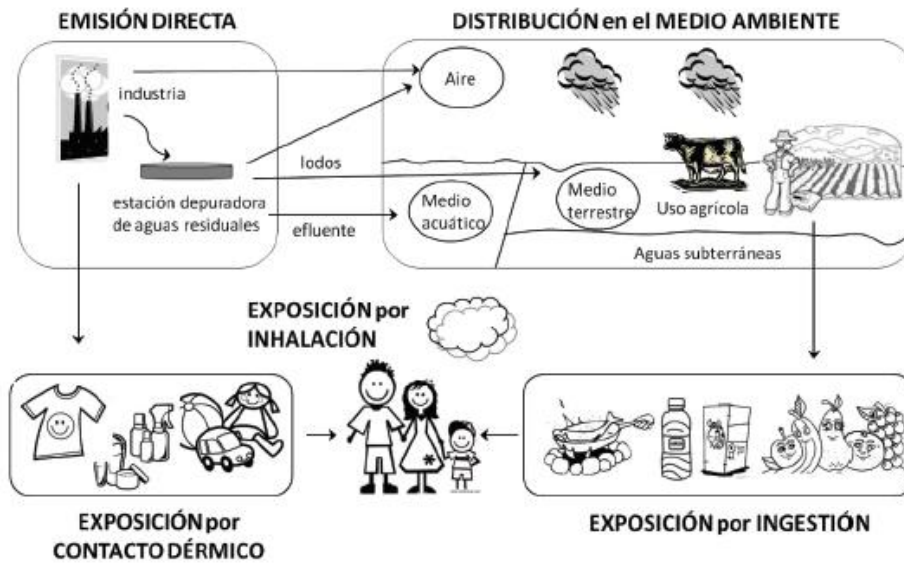


Figura 1. Origen y posible distribución de los PFCs en el medio ambiente (Salgueiro González, 2015).

## METODOLOGÍA

### *Organismos de ensayo*

Las holoturias u holoturoideos, conocidos vulgarmente como pepinos de mar o carajos de mar, son una clase del filo Equinodermos que incluye animales de cuerpo vermiforme alargado y blando que vive en casi todos los ambientes marinos, pero son más diversos en las aguas saladas poco profundas de los arrecifes coralinos. Habitan desde el medio intersticial, donde pueden quedar expuestos en la marea baja, hasta las profundas fosas oceánicas. Muchas especies viven enterradas en sedimentos blandos, siendo por tanto bentónicas; pero muchas pueden nadar, y algunas incluso son miembros del plancton, flotando a merced de las corrientes. Se conocen unas 1.400 especies.

De acuerdo con algunos autores, estos organismos pueden servir como buenos centinelas para controlar los microcontaminantes orgánicos en el medio marino. Son un componente esencial de los ecosistemas marinos, pues son limpiadores del fondo y liberadores de nutrientes a partir de restos orgánicos. Son funcionalmente importantes en la transferencia de estos contaminantes a niveles tróficos superiores ya que son una fuente importante de alimentos para peces y aves acuáticas. Además, a pesar de que su aspecto y tacto nos puedan parecer un poco repulsivo son considerados un manjar en la cocina asiática. En estudios previos, estos animales han sido objeto de estudio principalmente de metales y compuestos orgánicos como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y algunos disruptores endocrinos (alquilfenoles, especies derivadas del estaño o bisfenol A) pudiendo comprobarse que, efectivamente, sus órganos muestran tendencia a la bioacumulación (Goutte y cols., 2013; Arslan y cols., 2007; Bellas y cols., 2005; Novelli y cols., 2002). Sin embargo, y según la extensa bibliografía consultada, ninguno de estos estudios se centra en los contaminantes seleccionados en la presente propuesta.

### *Toma de muestra*

Los especímenes de *Holoturia tubulosa* (n = 10) fueron tomados a mano por buceadores en ubicaciones aleatorias bajo el agua (modo de buceo subacuático en el que el buzo utiliza un aparato de respiración submarina con contenedor propio para bucear), completamente independiente del suministro superficial), a lo largo de un transecto de 50 m de largo y 7-13 m de profundidad en la zona infralitoral de la playa de Marina del Este (Almuñecar, sur de España, coordenadas: 36.720528, -3.728383) en el mes de Marzo de 2017. Las muestras fueron de tamaño similar (promedio de 100 g). Una descripción más detallada de la toma de muestra se recoge en Martín et al., 2017.

Una vez en el laboratorio, antes de la disección con bisturí, las holoturias se lavaron con agua destilada para eliminar la materia extraña y la suciedad. Para los análisis, se utilizaron los tractos digestivos y respiratorios y las gónadas (Figura 2). Las vísceras fueron liofilizadas, homogeneizadas y tamizadas. Cada muestra se transfirió a un frasco de vidrio y se almacenó en la oscuridad hasta la extracción y el análisis.



Figura 2. Disección con bisturí de una ría.

### Procedimiento analítico

El análisis de las muestras se realizó mediante extracción con disolventes, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas de triple cuádruplo (LC-MS/MS). La optimización de la metodología se realizó sobre las dos etapas fundamentales en las que se divide el procedimiento analítico: la determinación cromatográfica y el tratamiento de la muestra.

### Determinación cromatográfica

La determinación de los PFCs se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución de la marca Agilent con bomba binaria de alta presión, inyector automático y compartimento termostatzado para la columna.

Para la separación de los compuestos, se optó por una columna de octadecilsilano HALO (50 mm × 2.1 mm; 1.6 μm de tamaño de partículas) y una disolución acuosa de acetato amónico (10 mM) y metanol como fase móvil. Se siguió un programa de elución en gradiente, comenzando con una pequeña proporción de metanol (20 %) junto con la fase acuosa, aumentando, posteriormente, la proporción de fase orgánica hasta el 100 % en 5 minutos.

El cromatógrafo de líquidos está acoplado a un detector de espectrometría de masas triple cuádrupolo equipado con una fuente de ionización por electrospray trabajando en modo negativo. Para cada analito se seleccionan las dos transiciones más abundantes tras la rotura del ion precursor. En la Tabla 1 se muestran los parámetros optimizados empleados en el espectrómetro de masas. En la Figura 3 se muestra un cromatograma para una mezcla patrón de 50 ng/mL de los PFCs objeto de estudio en las condiciones descritas.

Tabla 1. Parámetros LC-MS/MS.

Nombre	Sigla	Ion Precursor (m/z)	MRM 1 (m/z)	MRM 2 (m/z)
Ácido perfluoropentanoico	PFPeA	263	219	89,7
Ácido perfluorohexanoico	PFHxA	313	269	119
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	363	319	333
Ácido perfluorooctanoico	PFOA	413	369	194
Sulfonato de perfluorooctano	PFOS	499	80	51
Ácido perfluoro-n-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]octanoico	I.S PFOA	417	371	168

MRM 1: Transición utilizada para la cuantificación; MRM 2: Transición utilizada para la confirmación.

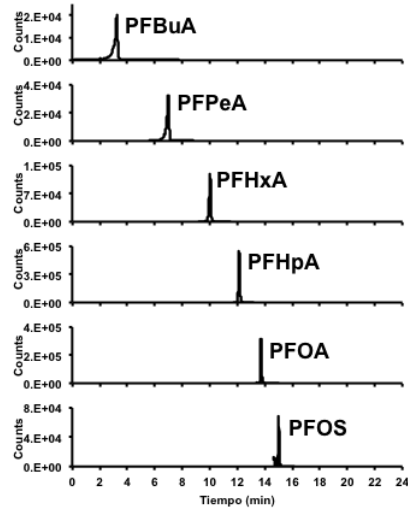


Figura 3. Separación cromatográfica de los compuestos objeto de estudio por LC-MS/MS.

### Tratamiento de la muestra

Para la extracción de los PFCs se pesaron 0,5 g de vísceras de holoturias, previamente liofilizada y tamizada a un tamaño de partícula de 0,1 mm, un tubo de ensayo y se añadió 0,1 mL de patrón interno (200 ng/mL). La extracción se realizó empleando de 7 mL de acetonitrilo. Para cada extracción, se añadió el disolvente, se agitó en vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 4050 x g durante 10 min. El líquido sobrenadante se retiró a un tubo de ensayo y la fracción sólida se sometió de nuevo al proceso de extracción. Una vez reunidas las fracciones líquidas, se realizó una etapa de limpieza sobre el extracto mediante extracción en fase sólida dispersiva. Para ello, se añadieron 800 mg de C18, se agitó la mezcla durante 2 min y se centrifugó a 4050 x g durante 5 min. La fase orgánica se retiró a un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad empleando corriente de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó con 0,25 mL de una mezcla metanol:agua 1:1 (v/v) y se filtró a 0,22  $\mu$ m. En la Figura 4 se muestra un esquema del procedimiento analítico seguido para la cuantificación de PFCs en holoturias.



Figura 4. Procedimiento analítico para el análisis de PFCs en muestras de holoturia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Validación del método

#### Recuperación

La recuperación del método se evaluará sobre muestras de biota dopadas. Se prepararan por triplicado muestras dopadas y blancos y se compararan las áreas de pico obtenidas en las muestras dopadas con las obtenidas en extractos de muestras, dopados tras el proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas se muestran en la Tabla 2.

#### Precisión

Se realizará por triplicado sobre muestras de biota dopadas. La precisión se expresará como desviación estándar relativa de las medidas realizadas. Los datos de precisión obtenidos para los distintos compuestos se muestran en la Tabla 2.

#### Límites de detección y cuantificación

Límite de detección (LD): Se expresará como la concentración para la cual la relación señal-ruido tiene un valor de 3. Los límites de detección de los distintos compuestos se muestran en la Tabla 2.

Límite de cuantificación (LC): Se expresará como la concentración para la cual la relación señal-ruido tiene un valor de 10. Los límites de cuantificación de los distintos compuestos se muestran en la Tabla 2.

#### Rango de linealidad

Se prepararán por triplicado nueve patrones de diferente concentración en los rangos de concentración indicados en la sección de calibración. Se representará la relación entre el área de pico del analito y el área de pico del patrón interno frente a la concentración. Se evaluará la linealidad a partir del valor de coeficiente de correlación de la recta de calibrado obtenida por el método de los mínimos cuadrados. El valor del coeficiente de correlación deberá ser superior a 0,990.

Tabla 2. Recuperación, precisión, linealidad y límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método.

PFCs	Recuperación (%)	Precisión (% RSD)	Linealidad R <sup>2</sup>	LD (µg/kg ps)	LC (µg/kg ps)
<b>PFBuA</b>	101	0,2	0,998	0,01	0,03
<b>PFPeA</b>	99	8,0	1,000	0,01	0,03
<b>PFHxA</b>	94	8,5	0,999	0,01	0,03
<b>PFHpA</b>	92	5,7	0,999	0,01	0,03
<b>PFOA</b>	84	1,8	0,999	0,01	0,03
<b>PFOS</b>	85	9,4	0,995	0,01	0,03

#### Monitorización de PFCs en holoturia tubulosa

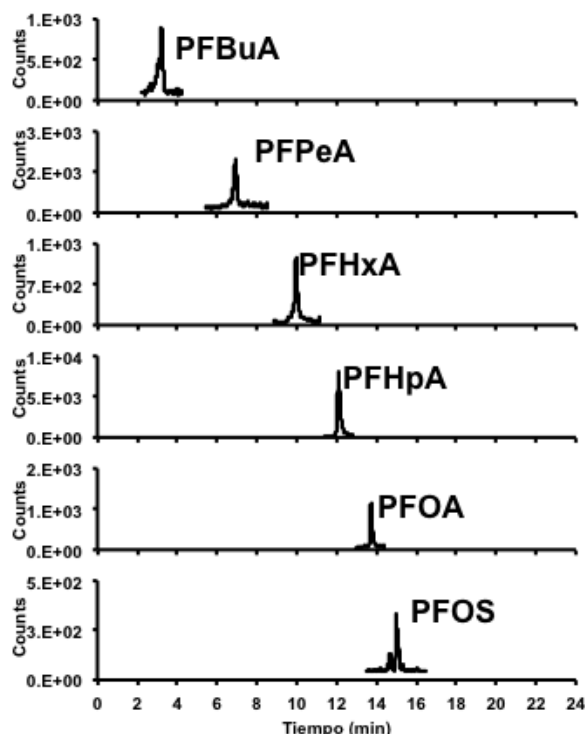
Tras la validación del método, las muestras fueron tratadas como se describe en la sección 6 y se determinó la concentración de los analitos de interés bajo las condiciones establecidas. El análisis se realizó en todos los casos por duplicado. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos y en la Figura 5 un cromatograma de una muestra de holoturia.

**Tabla 3.** Concentraciones de PFCs (ng/g (ps)) medidas en holoturias.

Holoturia	PFBuA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFOS
H1	9,19	5,07	32,7	162	179	25,0
H2	7,58	4,81	31,6	159	172	23,1
H3	5,22	0,81	11,7	56,6	51,4	3,01
H4	4,61	1,41	11,6	53,1	51,3	2,41
H5	1,59	<LC	2,60	11,4	25,0	10,1
H6	1,99	<LC	2,60	11,0	24,4	9,84
H7	37,2	31,8	6,52	17,3	65,5	72,7
H8	34,7	31,1	6,69	17,3	64,6	72,9
H9	55,4	26,3	141	270	667	95,1
H10	48,9	78,0	174	484	150	21,3

Los resultados demuestran la incorporación de estos contaminantes emergentes en dichos organismos. Todas las muestras dieron positivos en el análisis de los contaminantes con concentraciones desde 0,81 ng/g (ps) para el PFPeA hasta 667 ng/g (ps) para el PFOA. De manera general, los compuestos perfluorados de mayor cadena fluorocarbonada fueron cuantificados a concentraciones más elevadas que los de cadena corta, fundamentalmente PFOS y PFOA. Ambos compuestos, según estudios recientes, son tóxicos y persistentes, el PFOA es además carcinogénico, y el PFOS presenta una fuerte tendencia a la bioacumulación.

Existen dos razones que podrían explicar las concentraciones encontradas para estos compuestos: La primera es que desde hace 60 años estos compuestos se han utilizado en productos tan cotidianos como las sartenes antiadherentes (el famoso Teflón), en la ropa “waterproof”, en cosméticos, en cajas de pizza o en los envases de palomitas de maíz. Los PFCs migran desde estos productos al aire, al polvo de casa, la comida o el agua potable. La segunda razón de su ubicuidad es que los PFCs son compuestos orgánicos persistentes, es decir, son compuestos que no se degradan fácilmente por lo que permanecen en el entorno años y que, además, se acumulan a lo largo de la cadena alimentaria.



**Figura 5.** Cromatograma de una muestra de holoturia.

## CONCLUSIONES

Los EDCs están en el punto de mira de estudios ambientales y ecotoxicológicos. Entre ellos destacan los PFCs, tanto por su amplio uso industrial y doméstico como por su elevada actividad estrogénica demostrando efectos adversos a niveles traza. Se descargan al medio ambiente a través de efluentes industriales y de estaciones depuradoras de aguas residuales afectando principalmente a organismos marinos donde pueden acumularse si se produce una exposición a largo plazo.

Debido a la complejidad de las muestras ambientales y a que estas sustancias se encuentran a niveles de trazas, es necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos, que permitan la determinación de estas sustancias a las concentraciones en que se encuentran en el medio. En este trabajo, se puso a punto una metodología analítica para la determinación simultánea de seis PFCs en *Holothuria tubulosa* consistente en la extracción de los contaminantes mediante disolventes, limpieza del extracto por extracción en fase sólida dispersiva y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

Se validó la metodología obteniendo parámetros analíticos satisfactorios. Las recuperaciones obtenidas se situaron en el rango de 84 a 101 % con desviaciones estándar relativas inferior a 9 % y límites de cuantificación inferior a 0,03 ng/g (ps).

Todas las muestras dieron positivas en el análisis de los contaminantes. Los resultados obtenidos muestran concentraciones entre 667 ng/g (ps) para el PFOA y 0,81 ng/g (ps) para el PFPeA. De manera general, los compuestos perfluorados de mayor cadena fluorocarbonada fueron cuantificados a concentraciones más elevadas que los de cadena corta. Estos resultados preliminares muestran la necesidad de futuros estudios para conocer su comportamiento y sus efectos, a fin de preservar la biodiversidad y proteger la salud pública.

## BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, DL; Lozano, N; Rice, CP; Ramirez, M; Torrents, A. (2016). Temporal trends of perfluoroalkyl substances in limed biosolids from a large municipal water resource recovery facility. *Journal of Environmental Management*, 165. 88-95.
- Arslan, AC; Parlak, H; Oral, R; Katalay, S. (2007). The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53. 214–219.
- Bellas, J; Beiras, R; Maríño-Balsa, JC; Fernández, N. (2005). Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology*, 14, 337–353.
- Benigni, R; Battistelli, CL; Bossa, C; Giuliani, A; Tcheremenskaia, O. (2017). Endocrine Disruptors: Data-based survey of in vivo tests, predictive models and the Adverse Outcome Pathway. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86. 18-24.
- Goutte, A; Chevreuil, M; Alliot, F; Chastel, O; Cherel, Y; Eléaume, M; Massé, G. (2013). Persistent organic pollutants in benthic and pelagic organisms off Adélie Land, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 77. 82–89.
- Kiyama, R; Wada-Kiyama, Y. (2015). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environmental International*, 83. 11-40.
- Martín, J; Zafra-Gómez, A; Hidalgo, F; Ibáñez-Yuste, AJ; Alonso, E; Vílchez, JL. (2017). Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 166. 336-348.
- Novelli, A; Losso, C; Ghetti, PF; Ghirardini, AV. (2002). Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-styles of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21. 859–864.



- Rahman-Kabir, E; Sharfin-Rahman, M; Rahman-Rahman, I. (2015). A review on endocrinedisruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, (1). 241-58.
- Salgueiro González, N. (2015). *Estudio de disruptores endocrinos en el medio ambiente*. Tesis Doctoral. Universida de la Coruña.