

## Determinación de fungicidas en piel y en baños de tenería

M. Reyes Reyes, Joaquim Font, Anna Bacardit, Sara Cuadros\*, Agustí Marsal\*

Escola d'Enginyeria d'Igualada, Universitat Politècnica de Catalunya, Plaça del Rei 15, 08700 Igualada, España

\* IQAC-CSIC, Departamento de Tecnología Química y de Tensoactivos, J. Girona, 18-26, 08034 Barcelona, España

### Resumen

En este artículo se presentan dos métodos de análisis para determinar fungicidas utilizados en la industria del cuero. Un método determina fungicidas en piel y el otro en baños de proceso de tenería. Las moléculas son 2-(tiocianometiltio)-benzotiazol (TCMTB), 4-cloro-3-metilfenol (PCMC), 2-fenilfenol (OPP), 2-octil-3 (2H)-isotiazolona (OIT) y también 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y 3-yodo-2-propinil-butilo (IPBC).

- En el método de determinación de fungicidas sobre piel, la preparación de la muestra y el proceso de extracción se ha realizado bajo las mismas condiciones que describe la norma UNE-EN ISO 13365:2011 Determinación del contenido en conservantes (TCMTB, PCMC, OPP, OIT) del cuero mediante cromatografía líquida. Se han introducido unas modificaciones en el método cromatográfico que permiten ampliar el número de conservantes a analizar de forma simultánea, mejorar la fiabilidad de las identificaciones así como la sensibilidad de la cuantificación. Se ha comprobado asimismo que el 2,4,6-triclorofenol (TCP) y el pentaclorofenol (PCP) no interfieren en la determinación.

- En el método de determinación de fungicidas en baños se ha desarrollado un método de extracción de fungicidas en muestras acuosas utilizando la técnica SPME (microextracción en fase sólida). La identificación y cuantificación se efectúa por cromatografía líquida con detector de fotodiodos (HPLC-PDA) utilizando el método cromatográfico descrito anteriormente.

La determinación de la concentración de fungicidas en muestras acuosas resulta especialmente útil para conocer la fracción disuelta en el baño. Este último dato permitirá, además, evaluar la toxicidad aportada a las aguas residuales.

La toxicidad es uno de los parámetros establecidos en el canon de las aguas residuales, y la presencia de fungicidas contribuye, conjuntamente con otros productos utilizados.

Finalmente se analizan muestras reales provenientes de baños de procesos de curtidos como herramienta de análisis de la eficacia en la aplicación de los fungicidas.

**Palabras clave:** fungicidas, biodegradación, baños.

### Introducción.

En la producción y distribución del cuero, pueden ocurrir dos tipos de biodegradación: la debida a bacterias y la debida a hongos. La primera generalmente ocurre en la etapa inicial del proceso; la segunda suele aparecer después del proceso de curtición.

Los hongos se manifiestan visualmente en forma de manchas. La piel sufre además una disminución de las propiedades físicas debido a una degradación del colágeno, reduciendo la calidad de la piel.

Los fungicidas son sustancias utilizadas para inhibir el crecimiento de hongos que causan la degradación del cuero.

El TCMTB, el fungicida más utilizado para controlar el crecimiento de hongos, no resulta del todo efectivo contra las diferentes cepas que pueden crecer y se suele combinar con dos o tres moléculas<sup>3</sup>. Aun así, la capacidad antifúngica en cueros de curtición vegetal o wet white es inferior que en cueros curtidos al cromo. Por esta razón se han propuesto otras moléculas como IPBC (3-yodo-2-propinil butil carbamato).

Cuadros et al. (2013) comparó la efectividad de los fungicidas TBZ (tiabendazol), DIMPTS (diyodometil-p-tolilsulfona), e IPBC en relación al TCMTB. Los resultados demostraron que tanto el DIMPTS como el

IPBC tienen muy buena capacidad antifúngica, frente al TCMTB. A igual cantidad ofertada, el DIMPTS y el IPBC demostraron mejor respuesta ante 5 cepas de hongos testados, mientras que TBZ y TCMTB solo protegían contra una de ellas. La toxicidad de los baños resultó ser, en orden creciente, IPBC < DIMPTS < TCMTB.

Los fungicidas más utilizados en la industria del cuero se clasifican en dos familias químicas: fenólicos (que incluyen PCMC y OPP) y heterocíclicos (que incluyen TCMTB, OIT y MBT). En la Figura 1 se presentan las estructuras químicas y los espectros UV de estas moléculas.

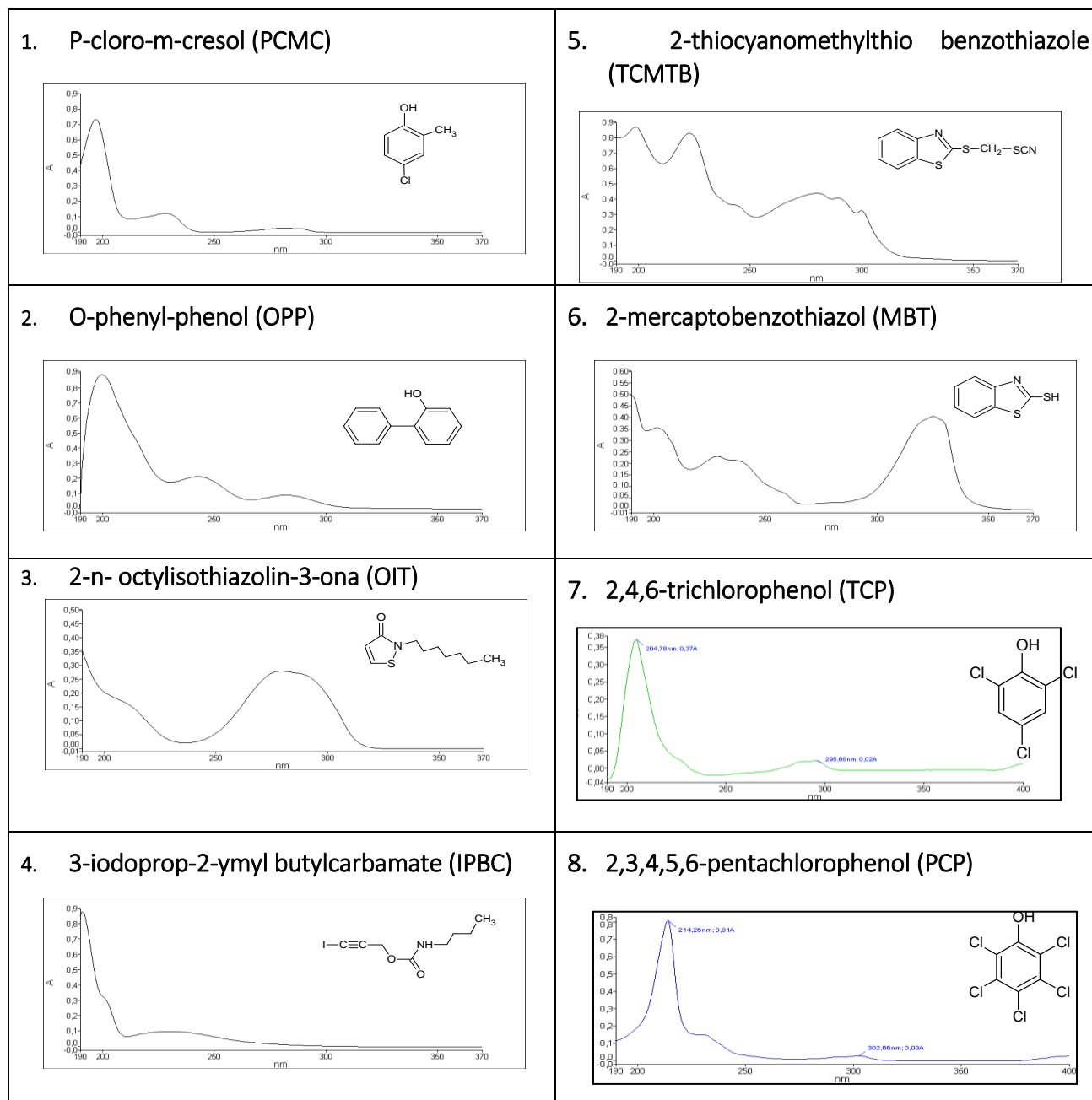


Figura 1. Espectros UV y estructura química de los fungicidas estudiados

## 2. Determinación de fungicidas en piel 5-7

### 2.1. Procedimiento experimental

#### 2.1.1. Instrumentación

Cromatógrafo HPLC Waters Alliance 2695 con detector de fotodiodos Waters PDA detector 2996.

Programa de gestión de datos Empower (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA).

Columna C18 Mediterranea Sea 18 15 x 46 cm, 3µm (Teknokroma)

La fase móvil fue agua al 0,1% de ácido fórmico (A): acetonitrilo al 0,1% de ácido

fórmico (B). Gradiente: 60% de B durante 6 min isocrático, después gradiente lineal hasta 95% de B en 9 min. El flujo fue de 0,9 mL / min y la temperatura 30°C. Volumen de inyección 20- $\mu$ L o inferior (10- $\mu$ L o 15- $\mu$ L) para muestras con altas concentraciones de fungicidas.

### 2.1.2. Material y reactivos

- Baño de ultrasonidos con regulación de tiempo y temperatura (Selecta)
- Filtros de membrana de PVDF de 0.45 micras (Micron Analítica)
- Acetonitrilo HPLC gradiente
- Agua ultrapura Milli- Q (Merck)
- Ácido fórmico para espectroscopia de masas (Fluka)
- Soluciones patrón de TCMTB y PCMC (Supelco), OIT, OPP y TCP (Fluka), MBT, IPBC y PCP (Aldrich), MBT (Lamirsa).

### 2.1.3. Muestras

Se analizaron cuarenta muestras comerciales de cuero de diferentes países. Veintiséis acabadas, catorce semi-procesadas (wet blue y wet white). Las muestras se tomaron en el período 2009-2011. Antes del análisis, todas las muestras se acondicionaron según la norma ISO 2419 en atmósfera estándar.

### 2.1.4. Procedimiento

Tal como describe la norma ISO 13365:2011, una porción de piel desfibrada se extrae en 20 mL de acetonitrilo en un baño de ultrasonidos durante 1 hora  $\pm$  5 min a temperatura ambiente. Después se filtra a través de un filtro de membrana de PVDF de 0.45  $\mu$ m en un vial.

El filtrado se analiza por HPLC. Los analitos se identifican por comparación del tiempo de retención con los de los estándares, y se confirman con un detector de fotiododos. Éste proporciona el espectro UV de cada analito, y con ayuda del software de gestión de datos lo compara con los espectros de los patrones previamente registrados. Los fungicidas detectados se cuantificaron utilizando las curvas de calibración previamente preparadas con las soluciones conocidas de patrones analíticos de los fungicidas.

## 2.2. Resultados y discusión

Las 40 muestras de piel comercializadas contenían al menos uno de los fungicidas determinados.

Las concentraciones oscilaron entre 440 y 540 mg/kg de TCMTB en pieles wet blue

nacionales en para exportación. En wet blue para periodos cortos de conservación, las concentraciones de TCMTB oscilaron entre 253 y 354 mg/kg. Una de estas muestras también contenía 154 mg/kg de MBT.

Todos los valores están expresados sobre peso de muestra acondicionada en atmósfera estándar.

La mayoría de muestras que contenían PCMC también contenían OPP. Las concentraciones detectadas de los dos fungicidas variaron de 8 a 680 mg/kg y de 8 a 480 mg/kg, respectivamente. Las concentraciones detectadas de MBT y OIT oscilaron de 4 a 154 mg/kg y de 44 a 230 mg/kg, respectivamente. Este trabajo ha ampliado el alcance de la norma ISO 13365: 2011 permitiendo la determinación simultánea de 8 moléculas fungicidas. Entre ellos se incluyen fungicidas como el IPBC y el MBT. La presencia de 2,4,6-triclorofenol (TCP) y pentaclorofenol (PCP) no interfiere en la determinación, tal como muestra el cromatograma de la Figura 2. Su detección es posible de forma simultánea junto al resto de conservantes.

Los cambios introducidos permiten mejorar la especificidad del método y los límites de detección, estableciendo una longitud de onda de detección específica para cada molécula, en lugar de una única como establece la norma. Por otra parte, el espectro de UV obtenido con el detector PDA permite la confirmación confiable de la identidad del analito.

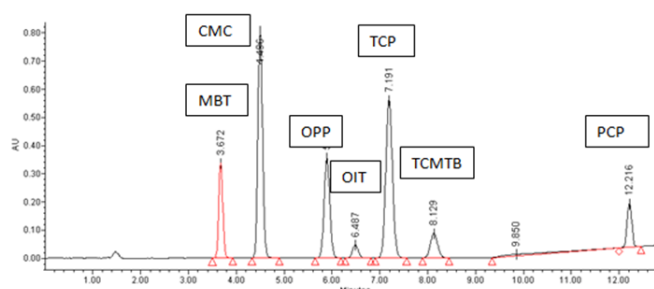


Figura 2. Cromatograma obtenido a 279nm

### Límites de detección y cuantificación

Se calcularon los límites de detección (LOD) para los diferentes fungicidas, definidos como la relación señal-ruido de 3 (S/N=3). También se calcularon los límites de cuantificación (LOQ), definidos como la relación señal-ruido de 10 (S/N=10). Los LODs de TCMTB, PCMC y OPP fueron medidos a más de una longitud de onda. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Una mayor señal no implica

necesariamente mayor sensibilidad, ya que dependerá del ruido de la línea de base. El espectro UV del TCMTB muestra un máximo de absorción a 223 nm. No obstante, los datos de la Tabla 1 muestran que para el TCMTB la longitud de onda de detección más sensible es 275 nm.

Para el OPP la longitud de onda de detección más sensible es 243 nm. Para PCMC, el LOD a 197 nm resultó ser aproximadamente 3 veces más sensible que a 228 nm. El LOD más bajo se obtuvo para MBT y el más alto para IPBC, como era de esperar.

Los resultados muestran que la sensibilidad del método descrito en este trabajo permite la cuantificación de los fungicidas en el rango de concentraciones utilizados en la industria del cuero.

Fungicida	Wavelength (nm)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)
OIT	279	0.46	1.5
OPP	201	2.2	7.3
	246	1.7	5.7
IPBC	193	17	57
MBT	324	0.06	0.2
	197	0.71	2.4
PCMC	201	1.3	4.3
	228	2.0	6.7
TCMTB	223	1.7	5.7
	275	1.2	4.0
TCP	203	1.7	5.7
PCP	214	0.39	1.3

#### Linealidad, recuperación y precisión

El estudio de recuperación se llevó a cabo con una piel de vaca curtida sin adición de fungicidas y analizada posteriormente para su verificación. Este blanco wet blue sirvió de base para el diseño del estudio. La muestra se secó a 25 °C y posteriormente desfibrada en molino.

Porciones de 1 g fueron fortificados con disoluciones patrón cubriendo los rangos especificados en la Tabla 2. Se prepararon 5 patrones en el rango 2-40 mg/L de OPP, OIT, PCMC, PCP y TCMTB. Para el MBT el intervalo de los patrones fue de 0,5-20 mg/L y

para el IPBC de 5-50 mg/L. Los niveles fueron seleccionados para reproducir los rangos de concentración encontrados en muestras reales según Hauber y Germann 10,11.

La recuperación promedio fue superior al 84% en todos los casos. Para el TCMTB, la recuperación del método fue del 99% en el nivel de concentración de 300 mg/kg.

La precisión del método se evaluó calculando la desviación estándar relativa (RSD) en el estudio de recuperación. Los valores RSD fueron inferiores al ±5%. Los resultados están incluidos en la Tabla 2.

La linealidad se verificó en todo el rango de trabajo. Los coeficientes de correlación fueron todas superiores a 0.999.

Fungicida	Longitud de onda	Nivel (µg/g)	Recuperación (%)	% RSD (n=3)
OIT	279 nm	30	84	± 1.7
		350	91	± 4.6
OPP	201 nm	50	92	± 0.8
		450	96	± 0.8
OPP	246 nm	50	95	± 0.4
		450	96	± 0.3
IPBC	193 nm	130	98	± 5.0
		300	88	± 3.5
MBT	324 nm	20	88	± 1.8
		250	88	± 1.6
PCMC	201 nm	70	91	± 0.1
		600	98	± 1.1
PCMC	228 nm	70	93	± 0.5
		600	96	± 0.3
TCMTB	223 nm	30	94	± 5.0
		300	99	± 0.6

Tabla 2. Recuperaciones de 6 fungicidas a dos niveles de concentración

#### Selección de la longitud de onda de detección

Se deben tener en cuenta tres criterios al elegir la longitud de onda de detección: la sensibilidad, precisión y selectividad. La sensibilidad es mayor a longitudes de onda más cortas, a excepción de MBT y OIT. Sin embargo, la precisión de los análisis es mejor en longitudes de onda más largas. Por ejemplo, en el análisis de una muestra de cuero comercial, la desviación estándar relativa de ocho determinaciones de OPP en 201 nm fue de ± 3,8%, mientras que a 246 nm fue sólo ± 1,5%.

Finalmente, una adecuada selección de la longitud de onda mejora la selectividad de la cromatografía. Los cromatogramas de algunas muestras de cuero acabado son complejos, con más picos que los de las muestras de wet blue.

Aparecen picos de sustancias desconocidas en las proximidades de los tiempos de retención de los fungicidas de interés, que pueden interferir, en algunas muestras, siendo difícil una correcta integración de los picos. En estos casos, la selección de una longitud de onda donde la diferencia entre el fungicida y la interferencia sea máxima, mejorará la calidad del cromatograma.

### 2.3. Conclusiones

La selección de la longitud de onda de detección es específica para cada fungicida. El estudio muestra que, generalmente, la precisión de los análisis es mejor a longitudes de onda más largas. Sin embargo, la sensibilidad es mejor a longitudes de onda más cortas, a pesar de que sea habitual la aparición de interferencias.

Los resultados de los análisis de muestras reales muestran que el TCMTB es el fungicida más ampliamente utilizado como protector del cuero contra el ataque de hongos durante el almacenamiento.

## 3. Determinación de fungicidas en baños de tenería

### 3.1. Introducción

Hasta la fecha no se conoce ningún método para la determinación de fungicidas en aguas residuales del sector del cuero. El análisis de los baños antes y después del proceso de curtición es útil para conocer la eficacia de un tratamiento preventivo con fungicidas.

Parbery et al. (1989) determinó MBT y TCMTB en baños de licores de curtición por extracción líquido-líquido (LLE) con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y posterior separación y cuantificación por HPLC<sup>8</sup>.

Otros dos documentos se han publicado en relación a baños de tenería, pero sólo se ha determinado TCMTB. Hinojosa et al. (2002) sugirió la determinación espectrofotométrica por extracción indirecta después de descomponerse a 2-mercaptobenzotiazol<sup>9</sup> y Meneses et al. (2005) propuso la electroreducción de TCMTB y determinación electroanalítica<sup>10</sup>. Ninguno de estos métodos se ha aplicado a gran escala, debido a que el sector de la piel exige la determinación simultánea de diferentes compuestos conservantes. De hecho, se sabe muy poco sobre el contenido residual de fungicidas en un baño de cromo. Parbery et al. encontró entre 3 y 20 mg/L de TCMTB al final de diferentes

procesos e Hinojosa et al. encontró de 42 a 116 mg/L en licores analizados en sus investigaciones. Meneses et al. no aportó ningún dato sobre concentración de TCMTB en las muestras de aguas residuales industriales.

La falta de datos se debe a la dificultad de analizar este tipo de muestras, con una matriz compleja y altamente concentrada de residuos de curtición. En la fabricación de cuero, una parte de la oferta de cromo trivalente se mantiene en el baño agotado después de la etapa de curtición, con grandes cantidades de sustancias tales como sales de sodio, proteínas, aminoácidos, ácidos carboxílicos y grasas entre otros. Todo ello constituye una matriz de análisis compleja para la determinación cuantitativa del contenido residual de fungicidas a niveles de ppm.

Los métodos desarrollados para la determinación de TCMTB, MBT y otros benzimidazoles en aguas residuales industriales de curtición también son muy limitados. Fiehn et al.<sup>11</sup> y Reemtsma<sup>12</sup> utiliza HPLC de fase inversa acoplada a detección UV y espectrometría de masas, respectivamente. Aunque TCMTB se aplica en el proceso de curtición, no se detectó en ninguna muestra de baño residual de las tenerías analizadas debido a la hidrólisis conocida de TCMTB en condiciones alcalinas, así como tampoco en los efluentes de curtidurías.

Por lo tanto, los análisis para la determinación de TCMTB deben llevarse a cabo en los baños de curtición residuales antes de mezclarlos con otras aguas residuales.

El objetivo de este trabajo es describir un método rápido y sencillo para la determinación simultánea de TCMTB y otros fungicidas en los baños de curtición residuales y evaluar los parámetros de su validación. La muestra de baño se diluye, se filtra, y los analitos se extraen por medio de la técnica de SPME. La determinación se lleva a cabo por HPLC-PDA después de la desorción de la fibra. La etapa de extracción del método desarrollado es absolutamente innovador en el campo del análisis del sector de la piel.

La etapa cromatográfica del método es la misma que la llevada a cabo en el método de análisis de fungicidas en piel<sup>13</sup>. HPLC-PDA fue la técnica seleccionada, ya que es adecuada

para la determinación simultánea de los diferentes fungicidas utilizados en la industria del cuero. Este es un método robusto para la gran cantidad de variaciones que las muestras reales pueden presentar, por ejemplo las variaciones que resultan del origen de estas muestras (baños residuales del proceso de curtición al cromo, wet white o vegetal) y de las características de los artículos finales de cuero que se fabrica. Por último, dado que es la misma técnica que se utiliza en la Norma UNE-EN ISO 13365 para la determinación de conservantes en pieles y cueros<sup>13,14</sup>, los laboratorios del sector del cuero ya cuentan con el equipo necesario.

El método clásico LLE implica tres extracciones secuenciales de la muestra con diclorometano. Las fases se separan por centrifugación<sup>8</sup>. Otros autores utilizan acetato de etilo (dos veces) y tolueno<sup>11</sup>. El disolvente orgánico residual debe ser eliminado por evaporación para ser reemplazado por metanol, acetonitrilo u otro disolvente compatible con el sistema de HPLC de fase inversa. En los análisis de algunos licores usados, se forman capas emulsionadas. Estas emulsiones son difíciles de romper y, por lo tanto, la recuperación cuantitativa de los conservantes no es fácil. LLE consume tiempo, utiliza disolventes orgánicos peligrosos y no es rentable.

Se han desarrollado métodos muy sensible basados en la extracción en fase sólida para la determinación de algunos pesticidas antiincrustantes en agua<sup>15,16</sup>. Sin embargo, de los fungicidas usados en la industria del cuero, sólo el TCMTB se ha incluido en dichos estudios. Además, estos métodos se han desarrollado para muestras de agua mediambientales con una matriz mucho más limpia que la que se encuentra en los baños residuales de una tenería.

SPME se ha utilizado en la determinación de fungicidas fenólicos y de benzimidazol, pero no simultáneamente. Esta técnica SPME tiene dos posibles enfoques: exposición de espacio de cabeza y de inmersión directa de la fibra en la muestra acuosa. Sin embargo, la extracción de SPME de fungicidas de la exposición del espacio de cabeza se limita sólo a los compuestos volátiles, con exclusión de moléculas como OPP, TCMTB y OIT.

López et al.<sup>17</sup> indicó que SPME la fibra Carboxen-polidimetilsiloxano (CAR / PDMS) de 75 µm es adecuada para la extracción de los fungicidas tipo benzimidazol en muestras de agua mediambientales. Sin embargo, Hu et al.<sup>18</sup> selecciona la fibra polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 60µm, por su mayor sensibilidad en la determinación de los fungicidas tipo benzimidazol en extractos acuosos de manzana.

Conservantes fenólicos se han sido extraído en muestras de agua medioambientales por inmersión directa SPME. Fibras polares, tales como poliacrilato (PA), PDMS-DVB, y la resina de Carbowax-templated (CW-TPR), han sido probados con éxito para extraer los compuestos fenólicos a partir de muestras de agua. Sin embargo, cuando se utiliza fibra de PA en SPME-HPLC, los compuestos fenólicos no son totalmente desorbidos de la fibra<sup>19-22</sup>.

La novedad de este trabajo radica en la etapa de extracción del método. Se basa en la técnica de SPME. Tiene claras ventajas sobre LLE: un marcado aumento de la sensibilidad; la simplicidad de la realización de la extracción en un solo ciclo de absorción y desorción, y un ahorro considerable en el tiempo, reactivos y residuos de laboratorio.

El método ha sido validado y aplicado en los análisis de diez baños de curtición residuales de cuatro empresas que producen diferentes tipos de artículos de cuero.

### 3.2. Procedimiento experimental

#### 3.2.1. Instrumentación

Cromatógrafo HPLC Waters Alliance 2695 con detector de fotodiodos Waters PDA detector 2996.

Programa de gestión de datos Empower (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA).

Columna C18 Mediterranea Sea 18 15 x 46 cm, 3µm (Teknokroma)

La fase móvil fue agua al 0,1% de ácido fórmico (A): acetonitrilo al 0,1% de ácido fórmico (B). Gradiente: 60% de B durante 6 min isocrático, después gradiente lineal hasta 95% de B en 9 min. El flujo fue de 0,9 mL / min y la temperatura 30°C. Volumen de inyección 20-µL o inferior (10-µL o 15-µL) para muestras con altas concentraciones de fungicidas.

#### 3.2.2. Material y reactivos

- Filtros de membrana de PVDF de 0.45 micras (Micron Analítica)

- Acetonitrilo HPLC gradiente
- Agua ultrapura Milli- Q (Merck)
- Ácido fórmico para espectroscopia de masas (Fluka)
- Soluciones patrón de TCMTB y PCMC (Supelco), OIT, OPP y TCP (Fluka), MBT y IPBC (Aldrich).
- Filtros cualitativos (Filtros Anovia)
- Fibra SPME con recubrimiento de polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) 65  $\mu\text{m}$  (Supelco) (Product number 57359-U).

Se utilizó TCP como patrón interno a una concentración de 6.25 mg/L. Solución para ajustar la fuerza iónica formada por NaCl al 30% w/v y 0.20% v/v de ácido fórmico.

### 3.2.3. Muestras

Se analizaron once muestras de baños residuales. Siete fueron de baños de cromo, dos de baños de wet white, uno de baño residual de recurtición .

### 3.2.4. Procedimiento

Etapa adsorción: 1,00 mL de baño filtrado se diluye con 10,0 ml de agua milli-Q. Se toma 1,00 ml (o 5,00 ml si contiene baja concentración) de esta disolución y se transfiere a un matraz aforado de 50 mL que contiene 25,0 mL de tampón de ajuste de fuerza iónica y 1,00 mL de solución de patrón interno. Se completa el aforo con agua Milli-Q. 8,0 ml de la solución anterior se transfieren a un vial de 10 mL. Un núcleo magnético de 2 mm de diámetro y 8 mm de largo se añade y se tapa el vial.

El vial tapado se precalienta a 30°C en un baño de agua durante cinco minutos. La velocidad de agitación se ajusta a 900 rpm. A continuación, se perfora el septum del vial con el tubo de protección de la fibra. Se sumerge la fibra en la solución durante 70 minutos a 30°C (FiguraFi 3).

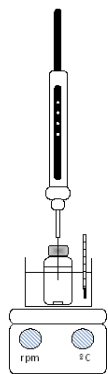


Figura 2. Fibra SPME en inmersión

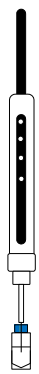


Figura 2. Fibra SPME en desorción

Etapa desorción: Una vez se ha completado la etapa de extracción, se introduce la fibra en un vial cónico que contiene 0.400 mL de una solución 60/40 acetonitrilo/agua. El vial se mantiene a 45°C durante 20 minutos (Figura 4).

Posteriormente, la fibra se retrae y el vial se homogeneiza. Un volumen de 25 o 50  $\mu\text{L}$  de esta solución se inyecta en el HPLC. Después de cada análisis, la fibra se lava con agua Milli-Q para eliminar los residuos de NaCl. La fibra puede ser reutilizada hasta que se detecta que la sensibilidad del método disminuye, es decir, cuando el área del pico disminuye sustancialmente. A partir de nuestra experiencia, la fibra puede ser reutilizada 75 - 85 veces.

La identidad del analito se determina por coincidencia del tiempo de retención con patrones, así como por comparación con el espectro UV.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando una calibración preparada con soluciones patrón de fungicidas extraídos de la misma manera que las muestras.

La sensibilidad y selectividad del método se ve reforzada por la selección de una longitud de onda de detección óptima específica para cada molécula. El uso de un detector PDA nos permite determinar cada fungicida en su propia longitud de onda óptima. De acuerdo con el trabajo anterior, las mejores

longitudes de onda de detección para cada molécula son los siguientes: para IPBC, 193 nm; para MBT, 324 nm; para OIT, 279 nm; para TCP, 290 nm; para OPP, 246 nm; para PCMC, 228 nm y para TCMTB, 223 nm.

### 3.3. Resultados y discusión

El desarrollo de un método de SPME implica la selección de la fibra y la optimización de las condiciones de desorción y adsorción.

#### Elección de fibra y Desarrollo de desorción Condiciones

Se compararon tres fibras comerciales diferentes: PDMS-DVB (60 micras), CAR-PDMS (75 m) y PDMS (100 micras). La mezcla de acetonitrilo/agua, utilizada como fase móvil en la norma UNE-EN ISO 13365 se utilizó como solución de desorción. El uso de acetonitrilo sólo no es aconsejable ya que esto acorta el tiempo de vida fibras<sup>20</sup>. Se estudió la influencia de la temperatura entre 25°C y 45°C.

El estudio de recuperación proporciono los mejores resultados a una temperatura de 45°C. Por otra parte, la acidificación de la solución de desorción con 0,1% de ácido fórmico empeora la recuperación para todas las fibras en estudio. Dado que la fibra de PDMS no tiene suficiente afinidad por los analitos, se descartó. Se llevaron a cabo estudios comparativos de desorción con las otras dos fibras a diferentes tiempos y temperaturas. Se concluyó que la fibra de PDMS-DVB permitió una desorción total después de 20 min a 45°C. Esta recuperación total que no se logró con la fibra CAR-PDMS aún después de prolongar el tiempo de desorción.

En consecuencia, se seleccionó la fibra PDMS-DVB para el estudio.

### Condiciones de adsorción

Hay algunas variables que se deben ajustar en SPME para lograr una buena eficiencia de extracción. Estos parámetros incluyen tiempo y temperatura de adsorción, volumen de la muestra, condiciones de agitación, y la fuerza iónica de la muestra.

El volumen de la muestra se fijó en 8,0 ml de modo que la fibra fue completamente sumergida, pero manteniendo una distancia segura con la barra de agitación. Un volumen inferior no se recomienda para evitar el riesgo de romper la fibra.

Para muchos compuestos orgánicos, la solubilidad acuosa disminuye en presencia de grandes cantidades de sal por efecto de la precipitación salina<sup>23</sup>. Dos pruebas con diferentes concentraciones de NaCl (5 y 15%), ambos con 0,1% de ácido fórmico, se llevaron a cabo para evaluar la influencia de la fuerza iónica.

Concentraciones de sal más altas pueden dañar la fibra<sup>17</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que para todos los fungicidas, con excepción de TCMTB, las recuperaciones mejoraron sustancialmente con la concentración de sal más alta (15% de NaCl). Por el contrario, la adsorción de TCMTB fue independiente de la concentración de sal.

Las temperaturas investigados fueron 30, 45, 60 y 75°C. Para todos los fungicidas, la adsorción máxima se alcanzó a 30°C.

La técnica de SPME se basa en el equilibrio establecido entre el medio acuoso y el recubrimiento de fibra. El tiempo necesario para alcanzar este equilibrio puede variar desde unos pocos minutos a varias horas.

El intervalo estudiado fue de 30, 50, 70, 90 y 120 min para cada analito, en la presencia de todos los otros compuestos de interés. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 900 rpm siempre con el mismo tipo de barra magnética. Los resultados mostraron que 120 min no eran suficientes para alcanzar el equilibrio. Jiu Ai<sup>24</sup> demostró que si el tiempo de adsorción y condiciones de agitación se mantienen constantes, no es necesario llegar al equilibrio para llevar a cabo un análisis cuantitativo reproducible. Esto se denomina condiciones de no equilibrio.

Se investigó la robustez de los resultados cuantitativos bajo condiciones de no equilibrio a los 70 min para tres niveles de concentración entre 0,1 y 1 mg/L. El mejor nivel para la calibración correspondía a la concentración más baja.

### Validación

#### Linealidad

Con el fin de compensar la posible disminución de eficiencia de la fibra durante su vida útil, se trabaja con patrón interno. Se utilizó 2 4,6-triclorofenol. La calibración se llevó a cabo por el mismo tratamiento como SPME muestras reales.

Las curvas de calibración se obtuvieron para cada uno de los seis fungicidas con disoluciones patrón de múltiples componentes que contiene todos los analitos. Se prepararon cuatro patrones de diferente concentración y un blanco. La Tabla 3 muestra el intervalo de concentraciones de las soluciones de extracción utilizados como patrones de calibración. La concentración del patrón interno fue 125µg/L en cada solución. Cada punto de la curva de calibración fue la media aritmética de dos inyecciones cromatográficas independientes.

Fungicide	Concentration range	Correlation coefficient (r)
TCMTB	48 - 244 µg/L	0.9992
PCMC	27 - 136 µg/L	0.9999
OPP	14 - 71 µg/L	0.9999
IPBC	199 - 995 µg/L	0.998
MBT	18 - 91 µg/L	0.998
OIT	21 - 108 µg/L	0.9999

Tabla 1. Rango y linealidad de calibración de cada analito



### Recuperación y precisión

Se prepararon muestras sintéticas a partir de un baño residual de curtición libre de fungicidas. Se fortificaron con cantidades conocidas de analitos. Las muestras se analizaron cada día durante una semana para medir la exactitud y la precisión del método. Los resultados obtenidos (media de la recuperación, así como la desviación estándar relativa) se presentan en Tabla 4.

Fungicida	Concentración	Recuperación (%, n=5)	RSD (%, n=5)
TCMTB	2.0 mg/L	95.0	± 8.6
PCMC	2.0 mg/L	116	± 12
OPP	1.7 mg/L	88.0	± 7.7
IPBC	14 mg/L	84.8	± 9.1
MBT	1.4 mg/L	81.9	± 12
OIT	1.9 mg/L	99.4	± 12

Tabla 2. Recuperación y precisión

### Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) se calcularon para una relación señal/ruido de 3. Se hizo una estimación también de los límites de cuantificación (LC) definidos como la relación señal/ruido de 10. Estos valores se calcularon para volúmenes de inyección de 50 µL, y se muestran en la Tabla 5.

Fungicide	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
TCMTB	0.25	0.83
PCMC	0.14	0.47
OPP	0.06	0.20
IPBC	6	17
MBT	0.05	0.17
OIT	0.07	0.25

Tabla 3. Límites de detección y cuantificación

### Robustez de calibración

Cuatro meses después se llevó a cabo una nueva calibración. Se prepararon nuevos patrones y se empleó la misma fibra utilizada unas 70 veces en adsorción-desorción. La prueba t de Student se utilizó para comparar los resultados de las dos calibraciones. No se detectaron diferencias significativas a pesar del envejecimiento de la fibra y la posible dispersión introducida como consecuencia de la preparación de nuevas disoluciones de patrones y reactivos. Tampoco influyeron las posibles desviaciones en la velocidad de agitación o debido al control de temperatura y tiempo de absorción-desorción.

### Análisis de muestras reales

El método se aplicó para analizar once muestras de baños residuales de curtición procedentes de cuatro empresas. Los resultados se presentan en la Tabla 6. Como puede verse, los baños residuales de 1 a 6 tienen mayores concentraciones que los baños de 7 a 11. Esto se puede explicar ya que las muestras 1 a 6 son baños residuales que proceden de dos tenerías que fabrican cuero en estado wet blue y wet white para almacenaje. Por el contrario, las muestras 7 a 11 son baños residuales procedentes de fábricas que utilizan menor concentración de fungicidas porque la piel se procesa hasta su etapa final de acabado. Algunos baños contienen más de una molécula fungicida. En la muestra número once PCMC y OPP se aplicó en el proceso de curtición y TCMTB en el engrase. No se presentó ningún problema en la fibra o con la resolución cromatográfica en el análisis de estas muestras reales con matrices de complejos.

Muestra	Fungicida detectado	Concentración hallada
Baño residual wet blue. Empresa 1-wb1.	TCMTB	78.5 mg/L
Baño residual wet blue. Empresa 1-wb2.	TCMTB	77.7 mg/L
Baño residual wet blue. Empresa 1-wb3.	TCMTB	47.2 mg/L
Baño residual wet white. Empresa 1-ww4.	TCMTB	18.7 mg/L
Baño residual wet white. Empresa 1-ww5.	TCMTB	20.2 mg/L
Baño residual wet blue. Empresa 2-wb6.	TCMTB	28.2 mg/L
Baño residual curtición. Empresa 3-tan7.	TCMTB	6.0 mg/L
Baño residual curtición. Empresa 3-tan8.	TCMTB	5.7 mg/L
Baño residual curtición. Empresa 3-tan9.	TCMTB	5.3 mg/L
Baño residual recurtición. Empresa 3-ret10.	TCMTB PCMC OIT	4.7 mg/L 2.4 mg/L 2.1 mg/L
Baño residual de engrase en producción de piel vegetal. Empresa 4-veg11.	TCMTB PCMC OPP	2.7 mg/L 7.0 mg/L 2.2 mg/L

Tabla 6. Resultados obtenidos del análisis de once baños residuales de diferentes empresas

### 3.4. Conclusiones

Se ha desarrollado un método muy sensible y altamente específico basado en la micro extracción en fase sólida y cromatografía líquida con detección de fotodiodos, para la determinación de conservantes en baños residuales de curtición.

Este método evita el uso de reactivos poco saludables como disolventes, y no genera residuos significativos de laboratorio. La preparación de la muestra consiste en unas 2 horas de extracción, filtración, y la inyección. El espectro UV de detección de PDA permite confirmar la identidad del analito de forma fiable. La longitud de onda utilizada para la determinación cuantitativa es específica para cada fungicida.

Los análisis de muestras reales mostraron cantidades residuales de TCMTB entre 28 y 80 mg/L en los baños de curtición residuales de wet blue para almacenamiento. Y entre 5 y 6 mg/L en los baños wet blue para rebajar y recurtir en un breve periodo de tiempo.

Los baños residuales del proceso wet white contienen una menor cantidad de TCMTB. Esto es debido a un mejor rendimiento del proceso, debido a que la cantidad de TCMTB, la duración del proceso y el volumen del baño fueron los mismos que en la producción de wet blue. Por otra parte, las cantidades residuales de TCMTB en las pieles wet white fueron más elevadas que en las wet blue.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Sra Núria Muñoz, su contribución en parte de los ensayos experimentales. También se agradece al Ministerio Español de Ciencia e Innovación su aportación a través del Proyecto CTQ 2009 a 08.347.

### Bibliografía

1. Hauber, C. & Germann, H.-P. The addition of fungicides and their Penetration. *World Leather* 75–82 (1997).
2. Landau, L. *Biocides in leather. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki* (1937).
3. Orlita, A. Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **53**, 157–163 (2004).
4. Ramadori, L. New generation of fungicides for leather preservation. *Cuoio, Pelli, Matière Concia.* **86**, 19–23 (2010).
5. Planas, X. Determinació de TCMTB i altres fungicides en pells. (Treball Final de Carrera, UPC, Escola d'Enginyeria d'Igualada, 2004).
6. Vázquez, A. M. Implantació de noves aplicacions cromatogràfiques al laboratori de l'EUETII. (Treball Final de Carrera, UPC, Escola d'Enginyeria d'Igualada, 2004).
7. Bautista, S. Desenvolupament de Metodologia pel Control Analític de Fitosanitaris. (Treball Final de Carrera, UPC, Escola d'Enginyeria d'Igualada, 2006).
8. Parbery, C. & Taylor, C. D. Determination of methylene bis(thiocyanate) and 2-(thiocyanatomethylthio)benzo[d]thiazole in leather process liquors by high-performance liquid chromatography. *Analyst* **114**, 361–363 (1989).
9. Hinojosa Reyes, L., Wróbel, K. & Wróbel, K. Indirect extraction-spectrophotometric determination of 2-(thiocyanomethylthiol)benzothiazole in chrome tanning liquors after its breakdown to 2-mercaptobenzothiazole. *Talanta* **56**, 515–521 (2002).
10. Meneses, E. S., Arguelho, M. L. P. M. & Alves, J. P. H. Electroreduction of the antifouling agent TCMTB and its electroanalytical determination in tannery wastewaters. *Talanta* **67**, 682–5 (2005).
11. Fiehn, O., Reemtsma, T. & Jekel, M. Extraction and analysis of various benzothiazoles from industrial wastewater. *Anal. Chim. Acta* **295**, 297–305 (1994).
12. Reemtsma, T. Determination of 2-substituted benzothiazoles of industrial use from water by liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. **1618**, 1612–1618 (2000).
13. Font, J., Reyes, M., Cuadros, S., Bacardit, A. & Marsal, A. Determination of TCMTB and Other Fungicides in L eather. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **106**, 341–348 (2011).
14. AENOR (2011). Cuero. Ensayos químicos. Determinación del contenido en conservantes (TCMTB, PCMC, OPP, OIT) del cuero mediante cromatografía de líquidos. (ISO 13365:2011)
15. Martínez, K., Ferrer, I. & Barceló, D. Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **879**, 27–37 (2000).
16. Agüera, A., Piedra, L., Hernando, M. D. & Fernández-Alba, A. R. Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas chromatography–mass spectrometry with large-volume injection. *J. Chromatogr. A* **889**, 261–269 (2000).
17. López Monzón, a, Vega Moreno, D., Torres Padrón, M. E., Sosa Ferrera, Z. & Santana Rodríguez, J. J. Solid-phase microextraction of benzimidazole fungicides in environmental liquid samples and HPLC-fluorescence determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1957–63 (2007).

18. Hu, Y. *et al.* A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **25**, 314–9 (2008).
19. Möder, M., Schrader, S., Franck, U. & Popp, P. Determination of phenolic compounds in waste water by solid-phase micro extraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* **357**, 326–332 (1997).
20. González-Toledo, E., Prat, M. D. & Alpendurada, M. F. Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water. *J. Chromatogr. A* **923**, 45–52 (2001).
21. Sarrión, M. ., Santos, F. . & Galceran, M. . Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **947**, 155–165 (2002).
22. Peñalver, a, Pocerull, E., Borrull, F. & Marcé, R. M. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *J. Chromatogr. A* **953**, 79–87 (2002).
23. Pawliszyn, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. (Chemical Industry Press, 2009).
24. Ai, J. Solid Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Anal. Chem.* **69**, 1230–1236 (1997).