

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

**Análisis de 2-metilisoborneol y Geosmina
en Aguas de Consumo mediante
Microextracción en Fase Sólida en Espacio
en Cabeza-Cromatografía Gaseosa-
Espectrometría de Masas (HS-SPME-
GC/MS)**

Autor:

Diego Pardina Aizpitarte

Directoras:

Rosa María Alonso Rojas

María Luz Alonso Alonso

TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN QUÍMICA

**ANÁLISIS DE 2-METILISOBORNEOL Y GEOSMINA EN
AGUAS DE CONSUMO MEDIANTE HS-SPME-GC/MS**

MEMORIA PRESENTADA POR DIEGO PARDINA AIZPITARTE

FECHA DE MATRICULACIÓN Y DEFENSA: 17 de febrero de 2022

DIRECTOR/A: ROSA MARÍA ALONSO ROJAS Y MARÍA LUZ ALONSO ALONSO

DEPARTAMENTO: QUÍMICA ANALÍTICA

ÍNDICE

PÁG.

1. Introducción	1
1.1. Ruta sintética de la Geosmina y 2-Metilisoborneol en las cianobacterias	2
1.2. Potabilización del agua	4
1.2.1. Degradación del 2-metilisoborneol y la Geosmina en las plantas potabilizadoras	5
1.3. Métodos analíticos para la determinación de Geosmina y 2-Metilisoborneol en aguas..	6
1.4. Validación de un método analítico	13
1.4.1. Intervalo lineal	13
1.4.2. Límites de detección y cuantificación	14
1.4.3. Selectividad	14
1.4.4. Carry-over.....	14
1.4.5. Efecto matriz	14
1.4.6. Veracidad	14
1.4.7. Repetitividad	15
2. Objetivo.....	15
3. Desarrollo Experimental.....	16
3.1. Reactivos y Disoluciones.....	16
3.2. Instrumentación	16
3.3. Muestreo y Monitorización de 2-MIB y GM en muestras de agua	17
3.4. Optimización del método analítico HS-SPME-GC/MS	18
3.4.1. Selección de los iones m/z de los analitos y estándares internos	20
3.5. Validación del método analítico HS-SPME-GC/MS.....	20
3.5.1. Intervalo Lineal.....	20
3.5.2. Límites de Detección y Cuantificación	20
3.5.3. Selectividad	20

3.5.4. Carry-Over	20
3.5.5. Efecto Matriz	21
3.5.6. Veracidad y Repetitividad	21
4. Resultados	21
4.1 Optimización del Método analítico HS-SPME-GC/MS	21
4.1.1. Selección de los iones m/z de los analitos e IS.....	22
4.2. Validación del método analítico HS-SPME-GC/MS.....	24
4.2.1. Intervalo lineal	24
4.2.2. Límites de detección y cuantificación	25
4.2.3. Selectividad	25
4.2.4. Carry-Over	26
4.2.5. Efecto Matriz	27
4.2.6. Veracidad y Repetitividad	28
4.3. Aplicación del método analítico a muestras de agua	29
5. Conclusiones	30
6. Líneas futuras de investigación	30
7. Bibliografía	31

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso esencial para la vida. En los seres humanos constituye del 60 al 70 % de su peso corporal. A pesar de su abundancia, es un recurso finito. Un porcentaje superior al 90% del agua del planeta es salada, y del agua dulce más del 60% se encuentra en forma de hielo y nieve en las regiones polares. El resto de fuentes hídricas (ríos, lagos, arroyos) están siendo afectadas por la contaminación y el cambio climático, lo que redundará en una disminución de su disponibilidad ¹.

El agua que se ingiere proviene de diferentes fuentes, que incluyen agua potable (agua del grifo y embotellada), bebidas, contenido de humedad de los alimentos y agua producida por procesos oxidativos en nuestro organismo.

En 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente el derecho humano al abastecimiento de agua y al saneamiento. Todas las personas tienen derecho a disponer de forma continuada de agua suficiente, salubre, físicamente accesible, asequible y de una calidad aceptable, para uso personal y doméstico. El agua contaminada puede transmitir enfermedades como la diarrea, el cólera, la disentería, la fiebre tifoidea y la poliomielitis. Se calcula que la contaminación del agua potable provoca más de 502 000 muertes por diarrea al año y en 2017, más de 220 millones de personas necesitaron tratamiento preventivo para la esquistosomiasis, una enfermedad grave y crónica provocada por lombrices parasitarias contraídas por exposición a agua infestada ². Para prevenir posibles problemas de salud, el agua tiene que ser tratada mediante un proceso de saneamiento, en el cual se eliminen las sustancias que pueden ser perjudiciales para el ser humano, además de aquellas que modifiquen las propiedades organolépticas del agua.

La modificación de estas propiedades puede ser producida por las algas y las bacterias que normalmente, aparecen en presencia de materia orgánica a temperaturas altas. Las algas son las causantes de los problemas ocasionados por el sabor y el olor del agua potable en las instalaciones de tratamiento de agua de todo el mundo. El gusto y el olor son los principales indicadores de la seguridad del agua potable. Es habitual que los servicios de agua, especialmente los que se abastecen de embalses, reciban multitud de quejas de los consumidores sobre el sabor y el olor del agua potable, especialmente durante los periodos más cálidos del año. Estos problemas se asocian principalmente al 2-metilisoborneol (1,2,7,7-tetramethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, C₁₁H₂₀O) responsable del olor a moho y a la Geosmina

((4,4a,8a)-4,8a-dimetil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidronaftalen-4a-ol, $C_{12}H_{22}O$), que genera un olor a tierra. El 2-metilisoborneol (2-MIB) es generado por algas verdeazuladas, como la cianobacteria *Anabaena*, mientras que la Geosmina (GM) es producida principalmente por la antinobacteria *Streptomyces coelicolor* y otras cianobacterias ³.

El olor a moho del 2-MIB y a tierra de la GM, compuestos objeto de estudio de este trabajo, son detectables en niveles de concentración muy bajos, en torno a 10 ng/L. La existencia de brotes de algas y bacterias en un acuífero como consecuencia de altos niveles de nutrientes, genera el aumento de las concentraciones de los compuestos que alteran el olor y el sabor llegando hasta niveles por encima de los umbrales de detección. Aunque estos compuestos no son tóxicos y carecen de un valor regulado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), pueden servir de indicativo de la presencia de otros compuestos orgánicos o derivados de las cianobacterias como la microcistina, la cual si es tóxica ⁴.

El 2-MIB y la GM son alcoholes terciarios, cada uno de los cuales existe como enantiómeros (+) y (-). Los brotes de olores son causados por la producción biológica de enantiómeros naturales (-), (1R)2-MIB y (4S,4aS,8aR)GM, Figura 1, los cuales son 10 veces más potentes ⁵.

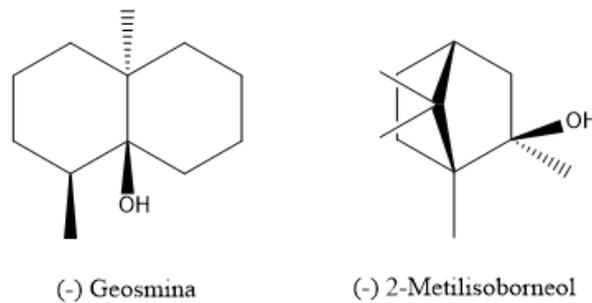


Figura 1.- Estructura de los enantiómeros (-) de la Geosmina y 2-metilisoborneol ⁵.

Ambos compuestos pertenecen a la familia de los terpenos, moléculas que se clasifican en base al número de unidades de isopreno ($CH_2=CH-C(CH_3)=CH_2$) que contienen.

1.1. RUTA SINTÉTICA DE LA GEOSMINA Y 2-METILISOBORNEOL EN LAS CIANOBACTERIAS

Los terpenos son productos metabólicos de algas y cianobacterias. Como se muestra en la Figura 2, el primer paso en su biosíntesis consiste en la condensación de una molécula de isopentenil difosfato (IPP) con difosfatos alílicos, como el dimetilalil difosfato (DMAPP). Se producen poliprenil difosfatos lineales, con longitudes de cadena específicas, como monoterpenos (C10),

sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20), dependiendo de los enzimas y del número de moléculas de IPP que intervienen en la reacción. Las enzimas geranyl difosfato (GDP) sintasa, farnesil difosfato (FDP) sintasa y geranylgeranyl difosfato (GGDP) sintasa catalizan las adiciones de una, dos y tres moléculas de IPP a DMAPP, respectivamente.

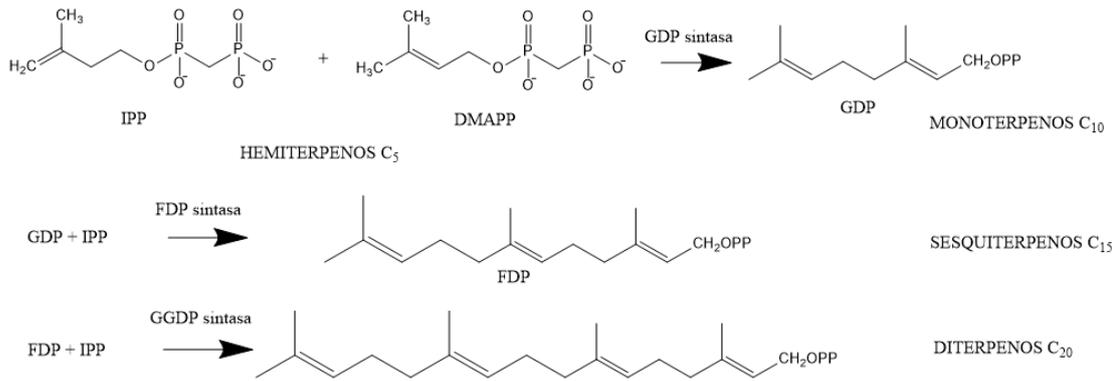


Figura 2.- Ruta sintética de los terpenos.

En plantas y hongos, estos poliprenil difosfatos generalmente se someten a una variedad de ciclaciones para producir los esqueletos parentales cíclicos de C10, C15 y C20, seguidos de una variedad de modificaciones, como hidroxilación, metilación y glicosilación, para dar lugar a multitud de metabolitos isoprenoides diferentes ⁶.

El 2-metilisoborneol es un monoterpeno, formado a partir de la ciclación de una molécula de GDP, que deriva de dos unidades de isopreno, la cual sufre un proceso de metilación transferido por una molécula de S-adenosil metionina (SAM) previo a la ciclación. Las reacciones son catalizadas por la enzima monoterpeno ciclasa, Figura 3 ⁶.

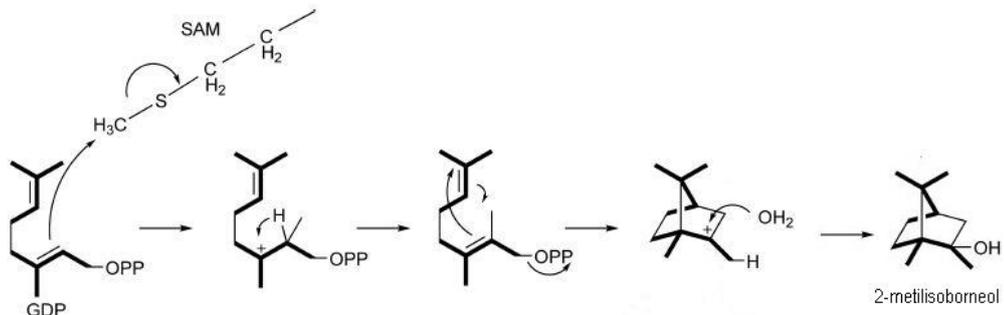


Figura 3.- Ciclación del geranyl difosfato (GDP) a 2-metilisoborneol ⁶.

La Geosmina es un sesquiterpenoide, formado a partir de la ciclación de una molécula de farnesil difosfato (FDP), que deriva de tres unidades de isopreno. La reacción de ciclación de la molécula de FDP para dar el intermedio de germacradienol es catalizada por la enzima germacradienol/geosmina sintasa. Este intermedio sufre una reacción de eliminación de una unidad C3 e hidroxilación en una reacción catalizada en presencia de Mg^{2+} , para dar lugar a la Geosmina, Figura 4 ⁶.

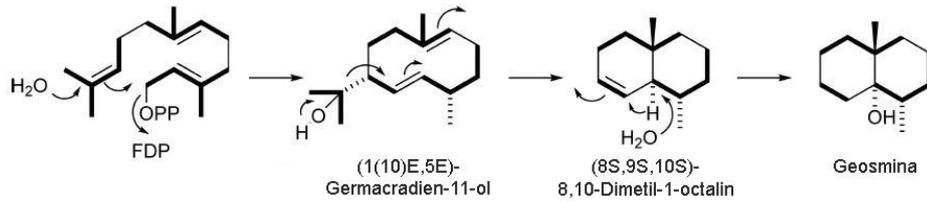


Figura 4.- Ciclación del farnesil difosfato (FDP) a Geosmina vía (1(10)E,5E)-germacradien-11-ol ⁶.

1.2. POTABILIZACIÓN DEL AGUA

El Real Decreto 140/2003 establece los criterios sanitarios de calidad del agua de consumo humano en España ⁷. Las plantas potabilizadoras son las responsables de llevar a cabo diferentes procesos de tratamiento del agua, entre ellos: oxidación, coagulación, floculación, decantación, filtración, desinfección y corrección del pH, Figura 5.

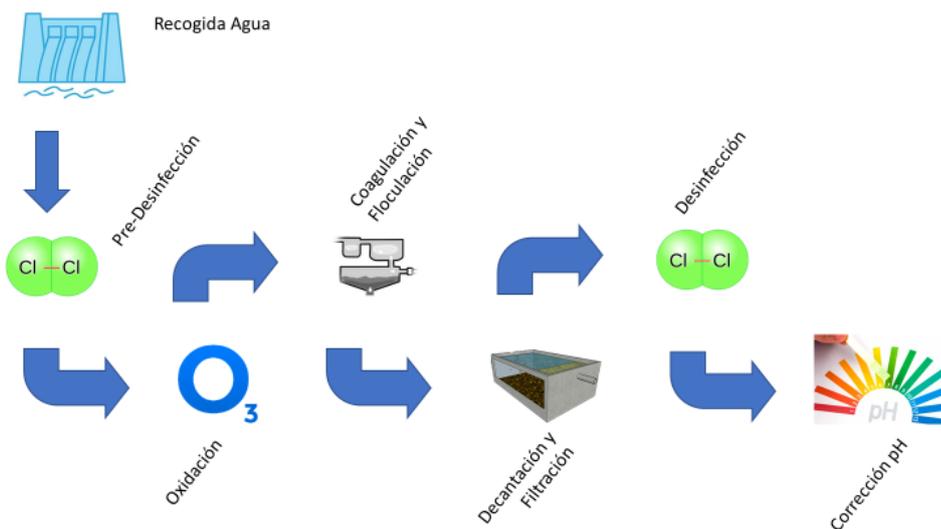


Figura 5.- Esquema de un proceso de tratamiento de potabilización del agua.

La estación de tratamiento de agua potable (ETAP) de Venta Alta en Arrigorriaga del Consorcio de Aguas Bilbao Bizkaia, principal instalación de potabilización de agua de Bizkaia, es la encargada de tratar las aguas que proceden de los embalses del Zadorra (Alava). El agua recogida y transportada contiene impurezas como partículas sólidas, magnesio, hierro y bacterias, que hay que eliminar antes de ser distribuida para su consumo. El tratamiento en esta ETAP consiste en un proceso inicial de cloración y oxidación para desinfectar y eliminar los elementos patógenos. Posteriormente el agua es trasladada a los depósitos de decantación donde reposa y facilita que las impurezas se depositen en el fondo formando lodos, operación acelerada gracias a la adición de reactivos químicos que permiten la agregación de las partículas que se encuentra disueltas (floculantes y coagulantes). De este modo, se forman coágulos pesados que se posan en el fondo de los decantadores, quedando el agua limpia en la superficie. El lodo sedimentado se retira, se seca y se lleva a un vertedero controlado. El agua decantada se distribuye en diversos filtros donde pasa a través de sucesivas capas de arena de distinto grosor, que retienen las partículas más pequeñas. Por último, se añade cloro, para asegurar su potabilidad en el proceso de distribución y se ajusta el pH ⁸.

1.2.1. Degradación del 2-metilisoborneol y la Geosmina en las plantas potabilizadoras

Los tratamientos convencionales de tratamiento de agua no son útiles a la hora de eliminar de una forma eficiente el 2-MIB y GM. Los compuestos de desinfección como el Cl₂, ClO₂ o KMnO₄ son inefectivos ya que estos oxidantes no son lo suficientemente fuertes como para romper los enlaces de los grupos alcohol del 2-MIB y la GM. Los procesos de adsorción, utilizando carbón activado o filtración de arena/coagulación con alumbre, no poseen una gran eficacia de eliminación de los analitos debido a la presencia de materia orgánica. La adsorción posee como inconvenientes la necesidad de un tratamiento adicional para que se regenere el carbón activado utilizado y el tratamiento de coagulación/filtración con arena no puede eliminar por completo 2-MIB. Recientemente, se han utilizado procesos de oxidación avanzada (AOP) como la irradiación ultrasónica, la degradación fotocatalítica o la ozonización ⁹ con el fin de eliminar estos dos compuestos. En las plantas de tratamiento de agua potable más avanzadas, como puede ser la de Venta Alta, la ozonización es el proceso más empleado para eliminar o descomponer estos compuestos responsables del sabor y del olor, así como de los trihalometanos, productos de desinfección, debido a su gran poder de oxidación.

Debido al alto poder oxidante del radical $\cdot\text{OH}$, el ozono se utiliza en el tratamiento de aguas para diferentes fines como: control de las algas, eliminación de la materia orgánica natural o la oxidación de microcontaminantes inorgánicos (Fe y Mn) y orgánicos (eliminación de olores y sabores, pesticidas) entre otros ¹⁰.

La eliminación de olores y sabores se lleva a cabo principalmente en la preozonización, etapa que se realiza en la cabeza de tratamiento para proteger a las líneas de conducción que van a la estación potabilizadora ¹⁰.

La eliminación de 2-MIB y GM depende de parámetros como el pH, dosis de ozono, tiempo de reacción, temperatura, concentración inicial, etc. Se ha llegado a eliminar más del 90% de 2-MIB y GM a un pH de 7.3 y a no detectarlos a un pH de 9.1 con una dosis de 30 minutos a una concentración inicial de 4,19 mg/L ¹¹.

Aunque la ozonización es una forma eficaz de descomponer los compuestos que causan olor en el agua, es muy costosa y produce subproductos de transformación como bromato, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos cuya toxicidad total aún es desconocida ¹². Teniendo en cuenta dichos inconvenientes, es posible que la aplicación de la técnica de ozonización deba combinarse con otras técnicas que ayudarán en la eliminación completa de 2-MIB y GM y otros subproductos tóxicos.

2-MIB y GM son detectables en niveles de concentración muy bajos, en torno a 10 ng/L. Por lo que es necesario poner a punto una metodología analítica adecuada para su control

1.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GEOSMINA Y 2-METILISOBORNEOL EN AGUAS

El 2-MIB y la GM en aguas de consumo se determinan preferentemente mediante cromatografía de gases (GC) ^{13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20}, debido a sus propiedades físico-químicas como sus bajas presiones de vapor y su polaridad, Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del 2-metilisoborneol y la Geosmina ^{21, 22}.

Analito	Fórmula química	Peso Molecular (g/mol)	Presión Vapor (mmHg, 25 °C)	T _{eb} (°C)	log K _{ow}
2-metilisoborneol (2MIB)	C ₁₁ H ₂₀ O	154,25	0,0049	207	2,93
Geosmina (GM)	C ₁₂ H ₂₂ O	182,30	0,003	270	3,57

Con el objetivo de corregir la fluctuación de la señal analítica, compensar errores de temperatura, diluciones, etc. se suele utilizar un estándar interno. Una concentración conocida de estándar interno se añade a las muestras, patrones y blanco. El estándar interno es una molécula, inexistente en las muestras, que se considera de referencia, similar química y físicamente al analito, sin causar ninguna interferencia ²³.

En la bibliografía se utilizan 1-clorooctano ¹⁴, cis-decahidro-1-naftol ¹⁵, 2-isobutil-3-metoxipirazina ¹⁶ e isoborneol ^{24,25} como estándares internos en la determinación mediante cromatografía gaseosa de los dos compuestos objeto de estudio. En este trabajo se han empleado el Isoborneol (IB) para el análisis de 2-MIB y el cis-decahidro-1-naftol (DHN) para la GM, Figura 6.

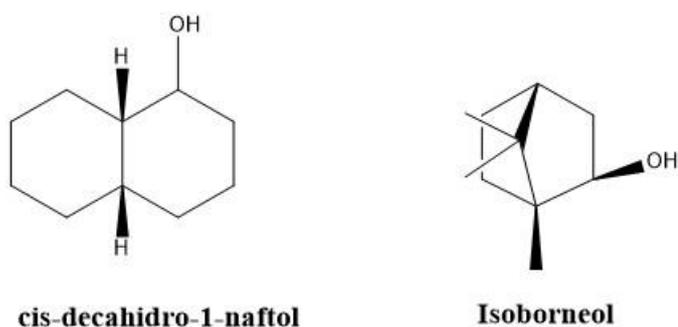


Figura 6.- Estructuras químicas del cis-decahidro-1-naftol e Isoborneol.

Los niveles de concentración tan bajos en los que se encuentran estos dos compuestos en las aguas de consumo hacen necesario un proceso de tratamiento de muestra que permita su preconcentración. En este sentido, la bibliografía recoge diferentes procedimientos entre los que cabe citar la extracción líquido-líquido (LLE) ¹⁴, la microextracción en fase líquida (LPME) ¹⁸,

la extracción por purga y trampa (P&T) ¹⁵, la extracción en fase sólida (SPE) ¹⁴ o la microextracción en fase sólida (SPME) ^{13, 16, 17, 19, 20}.

La LLE consiste en la separación del analito de la matriz utilizando un disolvente orgánico, Figura 7. El analito se transfiere de la solución acuosa a la fase orgánica en una transferencia de líquido a líquido. Esta separación se produce debido a la diferencia de solubilidad del analito en los dos líquidos. La LLE produce resultados fiables y sensibles para análisis de rutina en laboratorios de análisis químicos de aguas. Sin embargo, la LLE requiere grandes volúmenes de muestra y disolvente orgánico, lo que es caro y nocivo para el medio ambiente ²⁶.

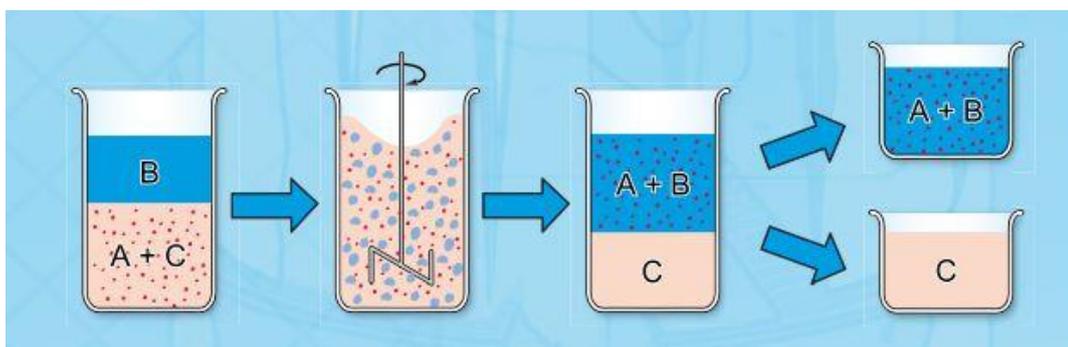


Figura 7.- Extracción líquido-líquido del soluto A desde la mezcla A + C a la fase B ²⁷.

LPME se puede definir como una miniaturización de la técnica LLE donde el volumen de la fase extractante es igual o inferior a 100 μ L. Las principales ventajas de las técnicas de LPME son la rapidez, la facilidad, el bajo costo, el bajo volumen de muestra, el consumo de solvente extremadamente bajo o incluso nulo y la generación reducida de desechos. Existen tres categorías principales de LPME: microextracción de una sola gota (SDME), microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y microextracción de fibra hueca (HF-LPME) ²⁸.

En la extracción por P&T, la muestra en un equipo cromatográfico preparado con un sistema de purga y trampa, se purga con un gas inerte (He o N₂) para desplazar los compuestos volátiles de la solución hacia la trampa, Figura 8. En consecuencia, el muestreo P&T puede proporcionar una alta eficiencia de extracción, lo que le hace muy adecuado para el análisis de trazas. Sin embargo, cuando se analizan matrices complejas o muestras sólidas altamente disueltas se produce la contaminación de la trampa. Así mismo, si la extracción requiere la adición de una sal, existe el riesgo de ensuciar los tubos de purga y las válvulas con sal, provocando abrasiones. Además, P&T utiliza con frecuencia un flujo de trabajo complicado que puede llevar mucho tiempo y requiere de equipos costosos ²⁶.

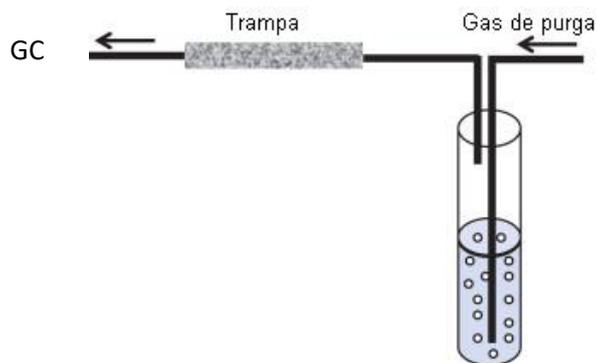


Figura 8.- Representación esquemática de una extracción por purga y trampa ²⁹.

La SPE es una técnica de tratamiento de muestra simple que generalmente involucra un dispositivo tipo cartucho con partículas de fase sólida estacionarias, Figura 9. La simplicidad de la operación y la capacidad de disponer de diferentes fases estacionarias para cada analito, hace que la SPE sea un método de análisis muy útil. Sin embargo, la necesidad de disolventes orgánicos para las etapas de acondicionamiento y elución; y el requisito de sustitución de cartuchos hace que sea un procedimiento poco respetuoso con el medio ambiente y potencialmente costoso para análisis de rutina ²⁶.

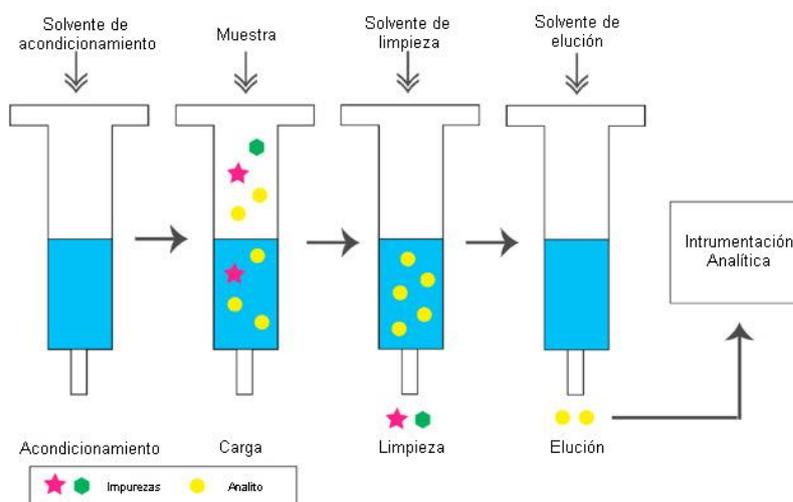


Figura 9.- Etapas de un procedimiento de extracción en fase sólida ³⁰.

La SPME es una de las técnicas de microextracción más utilizadas en la actualidad y es el procedimiento de uso más generalizado en la bibliografía para el análisis de GM y 2-MIB en aguas. Es un método muy versátil que es aplicable a la extracción de analitos de muestras gaseosas, líquidas o sólidas con un alto poder de preconcentración a niveles de trazas y con aplicaciones en diferentes áreas: análisis alimentario, medioambiental y farmacéutico. Se desarrolló principalmente para superar las limitaciones de las técnicas de SPE y LLE que

requieren grandes volúmenes de disolventes orgánicos. Además, SPME es un método de extracción simple, fácil de automatizar y rápido que puede integrar diferentes etapas en una: acondicionamiento, muestreo y extracción.

SPME es la técnica de extracción seleccionada en este trabajo y consta de una fibra recubierta con una fase estacionaria, ya sea un polímero líquido o un sorbente sólido, o una combinación de ambos. En una primera etapa la matriz de la muestra se expone durante un tiempo, a una temperatura y una agitación establecidos a la fase estacionaria de la fibra, hasta que el analito se introduce dentro del revestimiento de la fibra. La técnica de SPME puede realizarse en inmersión en una muestra líquida o en espacio en cabeza o head space (HS) ²⁶. En este trabajo se elige el segundo caso por tratarse del análisis de compuestos volátiles, Figura 10.

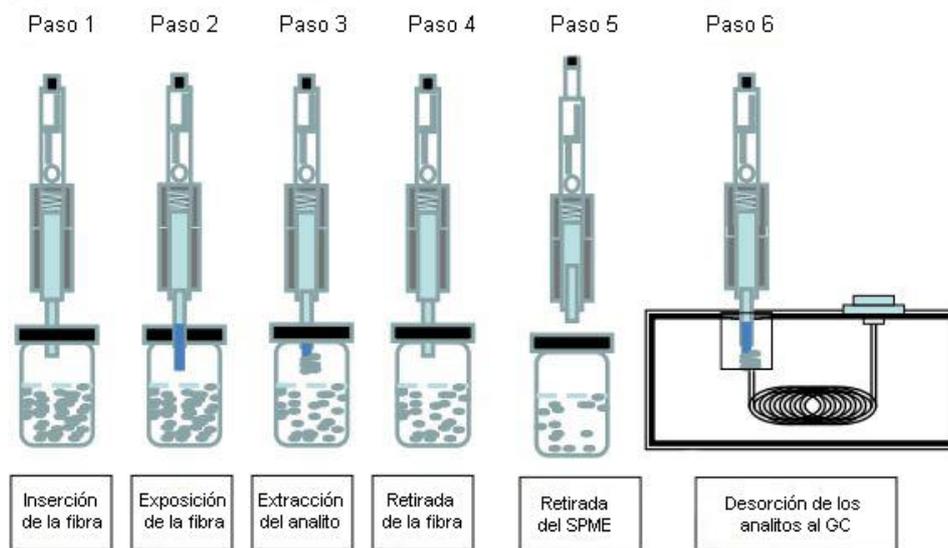


Figura 10.- Esquema de la metodología HS-SPME ³¹.

Después de un tiempo, la fibra se retira del espacio de cabeza del vial y se transfiere al puerto de inyección del equipo cromatográfico para su análisis.

La técnica analítica seleccionada, cromatografía de gases, se basa en la distribución o partición de un compuesto entre dos fases diferentes, una móvil y otra estacionaria, Figura 11. La fase móvil es un gas portador inerte (He, H₂ o N₂) y la fase estacionaria es una columna con un relleno sólido o un líquido recubierto de un sólido.

El flujo del gas portador se controla mediante reguladores de presión y válvulas dosificadoras de gas en el dispositivo de inyección de muestra con temperatura controlada. Se conecta una

columna de GC al puerto de inyección y las muestras se introducen en la corriente de gas portador a una temperatura suficiente para asegurar la vaporización de todos los componentes. Un detector conectado directamente a la salida de la columna monitoriza los componentes individuales de la muestra a medida que se eluyen de la columna separados por su volatilidad, presión de vapor y polaridad. El detector debe ser insensible al gas portador, mientras detecta los componentes de la muestra que se eluyen. Un registro de su respuesta con el tiempo da lugar a un cromatograma.

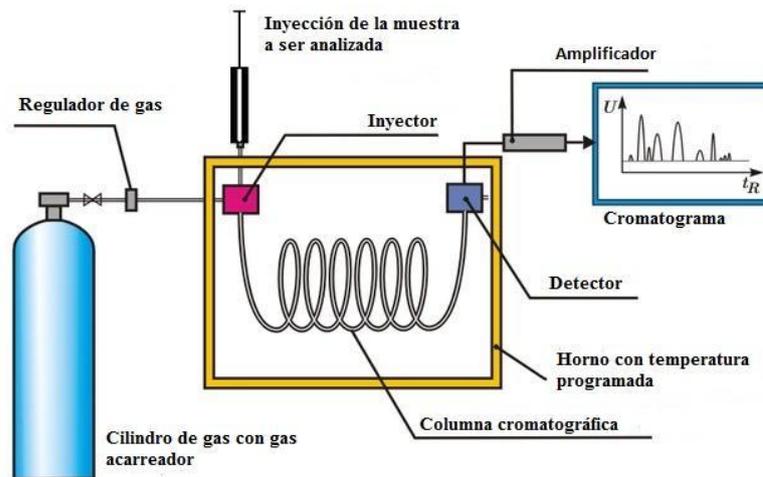


Figura 11.- Esquema de un cromatógrafo de gases ³².

Para la detección de los analitos una vez eluidos de la columna existen diferentes tipos de detectores, entre los que cabe citar el de ionización de llama (FID), captura electrónica (EC), conductividad térmica (TCD) y el de espectrometría de masas (MS). Un detector ideal debe poseer una alta sensibilidad, un amplio intervalo dinámico lineal y un pequeño volumen de celda para que el pico cromatográfico no se distorsione. En este trabajo se utilizará el detector de espectrometría de masas, dada la alta sensibilidad requerida para el análisis de 2-metilisoborneol y geosmina.

En la espectrometría de masas, las moléculas se ionizan en condiciones de vacío y se forma un grupo característico de iones de diferentes relaciones masa carga (m/z). Cuando estos iones se separan, el detector proporciona una representación de su abundancia relativa frente a la masa, que constituye un espectro de masas que se puede utilizar para identificar la molécula ³³.

Existen diferentes tipos de espectrómetros de masas dependiendo de los distintos componentes que lo formen. Como se muestra en la Figura 12, un espectrómetro de masas está formado por

una fuente de ionización que ioniza la muestra, un analizador que separa los iones en función de su masa/carga y un detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica ²³.

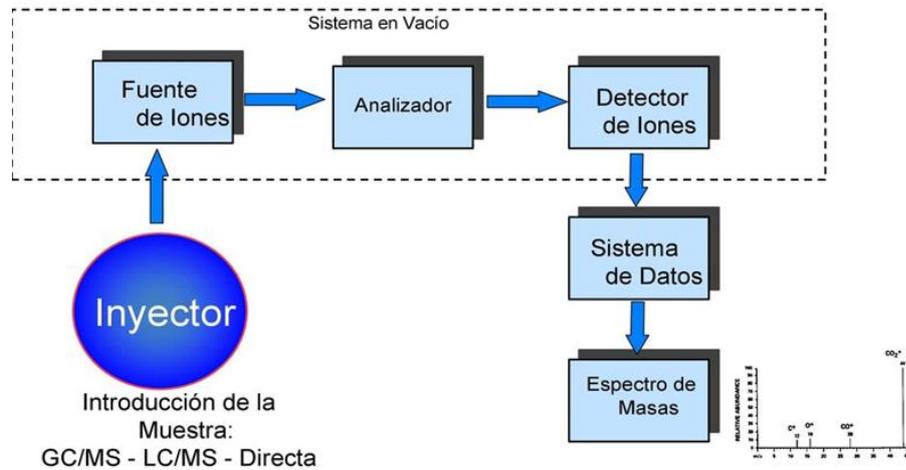
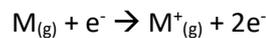


Figura 12.- Componentes de un espectrómetro de masas. (Agilent Technologies)

Las fuentes de ionización en espectrometría de masas acoplada a cromatografía gaseosa (GC/MS) incluyen la ionización por impacto de electrones (EI) y la ionización química. En la fuente EI, más comúnmente utilizada, las moléculas de analito se ionizan directamente a través de la colisión con una corriente de electrones de bombardeo, lo que resulta en la eliminación de un electrón para formar una especie catiónica radical.



En cuanto a la separación de los iones formados, hay varios tipos de analizadores de masas utilizados en GC/MS diferenciándose en la forma en la que separan las especies sobre la base de su masa/carga (m/z). Los más habituales son los analizadores de masas de tipo cuadrupolo, donde los iones se filtran utilizando potenciales electrostáticos aplicados a los elementos de los analizadores de masas que se utilizan para elegir iones que pasarán al detector de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Se trata de un detector de triple eje con multiplicador de iones (EM) de larga duración.

Existen dos modos de adquisición en GC/MS: SCAN y SIM. En modo SCAN se realiza un barrido de m/z, y se emplea con fines cualitativos. En modo SIM, se lleva a cabo una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. Este modo de adquisición proporciona mayor sensibilidad, al aumentar esta con la reducción del número de m/z seleccionados (ventana de detección). Además, también proporciona una mayor selectividad.

1.4. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método se define por la norma ISO 9000 ³⁴ como *confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto.*

Existen diferentes guías de validación en función del tipo de matrices estudiadas. En el caso concreto de matrices medioambientales como el agua, se distingue la guía de la Environmental Protection Agency (EPA) ³⁵. En este trabajo se llevará a cabo la validación del método HS-SPME-GC/MS siguiendo los parámetros establecidos por esta guía: linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), selectividad, carry-over y efecto matriz. Se utilizará la guía SANTE Nº12682/2019 ³⁶ de análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos para establecer los parámetros de veracidad y repetitividad

1.4.1. Intervalo lineal. Definido como el intervalo de concentración en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable en términos de porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), Ecuación 1, menor del 15% y con un coeficiente de correlación, $r^2 \geq 0,99$ para un calibrado con estándar interno en el que se representan los datos de áreas cromatográficas relativas-concentración.

$$RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s}$$

Donde:

RF = Factor de respuesta

A_s = Señal del analito

A_{is} = Señal del estándar interno

C_s = Concentración del analito

C_{is} = Concentración del estándar interno

$$\%RSD = \frac{SD}{\overline{RF}} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

SD = Desviación estándar de todos los RF de los puntos del calibrado

\overline{RF} = Factor de respuesta promedio de los puntos del calibrado

Así mismo se evaluó la bondad del calibrado en base al análisis de residuos, definidos como la diferencia entre la señal cromatográfica obtenida para cada concentración y la calculada mediante la curva de calibrado.

1.4.2. Límites de detección y cuantificación (LOD y LLOQ). Se definen como los valores de concentración mínima detectable y cuantificable, respectivamente. Las concentraciones se calculan interpolando en la curva de calibrado las señales obtenidas con las ecuaciones (2) y (3).

$$\text{Señal}_{\text{LOD}} = \text{Señal}_{\text{Blancos}} + 3 \cdot S_{\text{Blancos}} \quad (2)$$

$$\text{Señal}_{\text{LLOQ}} = \text{Señal}_{\text{Blancos}} + 10 \cdot S_{\text{Blancos}} \quad (3)$$

Donde la $\text{Señal}_{\text{Blancos}}$ se corresponde con el promedio de los valores de las áreas cromatográficas de los blancos realizados y S_{Blancos} su desviación estándar. La EPA además hace especial hincapié en el Límite inferior de cuantificación (LLOQ). El LLOQ es la concentración más baja a la cual el laboratorio ha demostrado que los analitos objetivo se pueden medir de manera fiable y proporcionar un cierto grado de confianza; y debe ser mayor o igual al punto más bajo de la curva de calibración. El criterio para aceptar el LLOQ consiste en que la recuperación obtenida para dicha concentración se encuentre entre un 80-120%.

1.4.3. Selectividad. Se relaciona con la capacidad de un método analítico para determinar los analitos de interés sin interferencias de otros componentes. Se demuestra mediante el análisis de muestras blancos, en las que no existen los analitos a determinar. Según la EPA un método es selectivo si las señales del blanco no superan el 50% de las señales del analito a nivel del LLOQ.

1.4.4. Carry-over. Efecto memoria en la señal cromatográfica producido por la contaminación de la fibra o de la columna por los analitos determinados con anterioridad. Se evalúa midiendo la señal de los analitos en una muestra blanco que ha sido inyectada posteriormente a una alta concentración de dichos analitos.

1.4.5. Efecto matriz. Influencia de la matriz en las señales analíticas obtenidas para nuestros compuestos de interés. Se determina comparando la señal obtenida de una muestra blanco dopada con una concentración de analito con la de un estándar de la misma concentración. Según la EPA, si la desviación obtenida entre la matriz estudiada y la referencia no supera el 20%, no es necesaria la utilización de un calibrado por adiciones estándar.

1.4.6. Veracidad. Proximidad de una media de resultados al valor de referencia. Se mide como porcentaje de recuperación mediante la Ecuación (4). Según la guía SANTE, se requiere un

mínimo de 5 réplicas en el LLOQ o a una concentración objetivo (concentración a la cual varían las propiedades organolépticas del agua), y al menos otro nivel superior, por ejemplo, 2-10 veces el LOQ. El valor de recuperación tiene que encontrarse entre un 80-120%.

$$\%Recuperación = \frac{Valor\ obtenido}{Valor\ real} \times 100 \quad (4)$$

1.4.7. Repetitividad. Se define como la variabilidad obtenida en los resultados de una medición siguiendo el mismo método analítico tanto en un periodo corto de tiempo (un único día) como en un periodo prolongado (varios días)²⁸. Se expresa en términos de %RSD con la Ecuación (5). Según la guía SANTE, se requiere un mínimo de 5 réplicas en el LLOQ o concentración objetivo y al menos otro nivel superior, por ejemplo, 2-10 veces el LOQ y el valor de %RSD tiene que encontrarse por debajo de un 20%.

$$\%RSD = \frac{SD}{Valor\ Medio} \times 100 \quad (5)$$

2. OBJETIVO

Dada la importancia del control de la calidad de las aguas de consumo y en concreto de sus propiedades organolépticas, el objetivo de este trabajo es la validación de un método analítico para la determinación de los dos componentes responsables de las propiedades organolépticas del agua, 2-metilisoborneol y geosmina en aguas de consumo.

Para la consecución de este objetivo será necesario estudiar en primer lugar el comportamiento cromatográfico de los dos compuestos a analizar mediante cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, posteriormente chequear la idoneidad para su determinación de un método analítico basado en HS-SPME-GC/MS, previamente optimizado por el grupo investigador FARMARTEM para el análisis de trihalometanos en aguas de consumo³⁷, y finalmente se procederá a la validación del método para su posterior aplicación a muestras de agua procedentes de estaciones de tratamiento de aguas potables.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.

Los compuestos (\pm) Geosmina (100 mg, 96,7%), Isoborneol (10 mg, 96,8%) y una disolución de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol de 2-metilisoborneol ($\pm 3,91 \mu\text{g}/\text{mL}$) fueron adquiridos a la casa comercial Dr. Ehrenstorfer (LGC Labor, Augsburg, Alemania). El cis-decahidro-1-naftol se adquirió a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Se almacenaron a la temperatura indicada por el proveedor, 20°C para (\pm) Geosmina y 4°C para el resto de compuestos. A partir de estos estándares se prepararon disoluciones stock en MeOH HPLC grade (Scharlab, Barcelona, España) de 1000 mg/L, 100 mg/L, 1 mg/L y 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ para Geosmina y de 20 mg/L, 1 mg/L y 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ para 2-metilisoborneol. Se prepararon disoluciones de los estándares internos IB y DHN en concentración 1000 mg/L, 100 mg/L, 1 mg/L y 10 $\mu\text{g}/\text{L}$.

La preparación de las muestras, de las disoluciones y de los blancos necesarios se llevó a cabo en viales headspace (HS) de 20 mL con tapones magnéticos con septa de PTFE/Silicona de 18 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

Se utilizaron 10 mL de agua Milli-Q, obtenida del sistema Milli-Q Advantage A10 de la marca Millipore (Massachusetts, EE. UU.) para la preparación de los blancos.

Con el objetivo de mantener un pH entre 4,8 y 5,5 en las muestras de agua, se adicionan a 500 mL de muestra, 8,4 g del tampón fosfato (EPA 551.1) constituido por 1 % de Na_2HPO_4 ($1,18 \times 10^{-3} \text{ M}$) y un 99 % de KH_2PO_4 en peso ($0,12 \times 10^{-3} \text{ M}$). utilizando Na_2HPO_4 (99%) y KH_2PO_4 (99%) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania).

3.2. INSTRUMENTACIÓN

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), con una columna DB-5MS UI de la misma casa comercial de 30 m x 0,320 mm, 0,25 μm , con una fase estacionaria constituida con un 5 % de fenil-metilpolisiloxano. Se ha utilizado helio (Air Liquide, Francia) como gas portador (pureza $\geq 99.999 \%$, Alphagaz). El detector utilizado consta de un espectrómetro de masas, modelo 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), con una fuente de ionización de impacto electrónico, 70 eV. Se emplea un inyector automático (PAL System CTC Analytics, Suiza), con el objetivo de automatizar la microextracción en fase sólida y mejorar la reproducibilidad de la inyección. Los resultados obtenidos por el cromatógrafo son analizados y monitorizados por dos

programas informáticos, uno para lanzar la secuencia y editar los parámetros de la separación cromatográfica y otro para visualizar los resultados obtenidos en el cromatograma (Pyro Data Analysis y MS ONLY Data Analysis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU).

La extracción mediante SPME se ha realizado utilizando una fibra de 60 µm de polidimetilsiloxano/divinil-benceno (60-PDMS/DVB), de la marca Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.).

Se ha empleado una balanza analítica de precisión de la marca Sartorius (Göttingen, Alemania) modelo CP224S para realizar las pesadas de los reactivos sólidos.

3.3. MUESTREO Y MONITORIZACIÓN DE 2-MIB Y GM EN MUESTRAS DE AGUA

El agua se recoge y se almacena en botellas ámbar de 60 mL con 1,06 g de la mezcla de tampón fosfato. Las botellas se llenan hasta un total de 63 mL, sin dejar espacio cabeza, para evitar la pérdida de los analitos por volatilización. Las muestras de agua analizadas se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipo de muestra, planta de tratamiento y fecha de toma de muestra.

Tipo de agua	Planta potabilizadora	Fecha de recogida
Previo Cloración	Venta Alta (Arrigorriaga, Vizcaya). Consorcio de Aguas del Gran Bilbao	15/10/2021
Tratada		
Previo Cloración		20/10/2021
Pre-consumo		
Previo Cloración		22/10/2021
Pre-consumo		28/10/2021
Post-oxidación		25/11/2021
Tras filtrar y decantar		
Tratada		
Consumo	Guriezo (Cantabria)	16/12/2021
Río		
Manantial		

El análisis de trihalometanos (THM), según el procedimiento optimizado en nuestro grupo de investigación, requiere que la muestra se diluya a la mitad con agua Milli-Q para ser analizada. Con el fin de mantener el mismo procedimiento, que permita la determinación simultánea tanto de los productos de desinfección, como del 2-MI y GM, 5 mL de cada muestra, diluida con 5 mL

de agua Milli-Q se analizan por triplicado mediante el método HS-SPME-GC/MS. Dada la baja concentración esperada de 2-MIB y GM se analizan también muestras sin dilución previa.

3.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO HS-SPME-GC/MS

Con el objetivo de obtener la mayor información posible de los compuestos presentes en las aguas de consumo utilizando un único método analítico, en este trabajo se ha intentado aplicar el método HS-SPME-GC/MS, previamente optimizado y validado para el análisis de THM³⁷ en muestras de aguas de la estación potabilizadora de Venta Alta del Consorcio de Aguas del Gran Bilbao, a la determinación de 2-MIB y GM.

Para ello, se estudió en primer lugar el comportamiento cromatográfico de disoluciones metanólicas de 2-MIB y GM en concentración de 100 µg/L y de los estándares internos en concentración de 100 ng/L IB y 250 ng/L DHN en las condiciones cromatográficas del método previamente optimizado, recogidas en la Tabla 3.

Los parámetros del método analítico a optimizar fueron la rampa de temperaturas y la utilización de estándares internos. Se modificará la rampa de temperaturas a partir del minuto 9 (para no influir en la separación cromatográfica de los THMs) con el objetivo de reducir el tiempo del cromatograma y por tanto del análisis.

Tabla 3. Condiciones instrumentales del método HS-SPME-GC/MS para la determinación de THM en aguas de consumo.

Método	Parámetros	
HS-SPME	Fibra SPME	60 PDMS/PVB
	Volumen de inyección (μL)	36
	Tiempo de pre-incubación (s)	180
	Temperatura incubación (°C)	55
	Velocidad de agitación (rpm)	500
	Penetración en vial (mm)	22
	Tiempo de extracción (s)	600
	Penetración en inyector (mm)	54
	Tiempo desorción (s)	120
	Tiempo de acondicionamiento de la fibra tras la inyección (s)	420
	Temperatura del inyector (°C)	200
	Flujo de gas de purga (mL/min)	100 (3-7 min)
GC/MS	Flujo de gas portador (mL/min)	1,2
	Rampa de temperaturas	<p>El gráfico muestra un calentamiento constante de 40°C a 250°C entre los 4 y 22 minutos. El eje Y es Temperatura °C (0-300) y el eje X es Tiempo (min) (0-26).</p>
	Temperatura de la línea de transferencia GC-MS (°C)	265
	Aceleración de electrones eV	70

3.4.1. Selección de los iones m/z de los analitos y estándares internos

Se realiza un análisis en modo SCAN (25- 300 m/z) de una disolución de concentración 100 µg/L de los analitos y los estándares internos con el fin de identificar sus picos cromatográficos, conocer sus tiempos de retención (tr) y seleccionaron los iones m/z para su cuantificación. Los analitos y estándares internos son identificados por comparación de los espectros de masas obtenidos experimentalmente, con los presentes en la biblioteca del National Institute of Standards and Technology, NIST11, que el cromatógrafo lleva incorporado.

3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO HS-SPME-GC/MS

Para llevar a cabo la validación del método HS-SPME-GC/MS se prepararon disoluciones de distintas concentraciones de los analitos en agua Milli-Q tamponada a pH 4,8-5,5 con un volumen total de 10 mL en viales HS de 20 mL. La concentración de los IS fue constante 250 ng/L para DHN y 100 ng/L para IB.

3.5.1. Intervalo Lineal

Teniendo en cuenta que la concentración para la cual las propiedades organolépticas del agua se ven alteradas ronda los 10 ng/L, se realizó una curva de calibrado multicomponente en el intervalo de concentraciones 4 – 50 ng/L para ambos analitos. Se prepararon 7 puntos de calibrado de concentraciones 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 ng/L.

3.5.2. Límites de Detección y Cuantificación

Para estimar los límites de detección y cuantificación de los analitos se analizaron 10 blancos. Se obtuvieron los valores de las áreas cromatográficas proporcionadas por los blancos a los tiempos de retención de cada analito.

3.5.3. Selectividad

El estudio de la selectividad del método se llevó a cabo mediante la inyección de 10 blancos. La señal analítica obtenida se compara con la proporcionada por las concentraciones de los LLOQs de cada analito a sus tiempos de retención.

3.5.4. Carry-Over

El estudio del posible efecto memoria se realizó mediante la inyección de un blanco después del análisis del punto de concentración más alto del calibrado, 50 ng/L.

3.5.5. Efecto Matriz

La evaluación de la existencia de efecto matriz se realizó comparando las medidas de tres muestras dopadas con 10 ng/L de cada analito: un blanco, una muestra y una muestra diluida a la mitad.

3.5.6. Veracidad y Repetitividad

Se estudió la veracidad y repetitividad del método en el día y entre días. Para ello se analizaron 5 muestras blanco el primer día y 3 durante otros dos días, dopadas a tres niveles de concentración: LLOQ, 10 ng/L (concentración límite/umbral para la cual las condiciones organolépticas se ven alteradas) y 25 ng/L.

4. RESULTADOS

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO HS-SPME-GC/MS

La rampa de temperaturas optimizada se muestra en la Figura 13. Se consiguió disminuir el t_r del pico de la GM (último analito en eluir) de 14,6 minutos a 12,95 min.

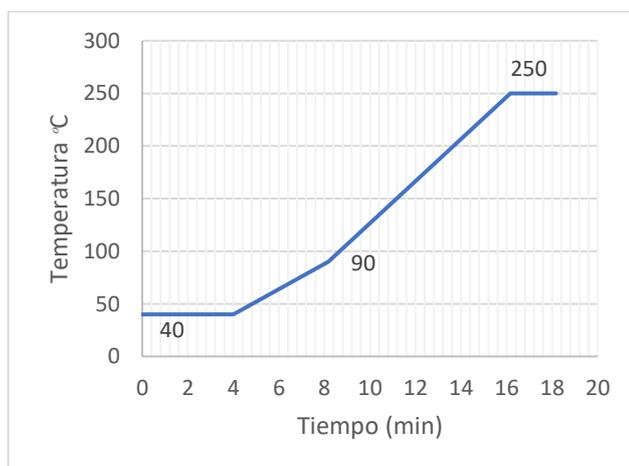


Figura 13: Rampa de temperaturas optimizada.

En la Figura 14 se muestra el cromatograma del análisis en modo SCAN de un blanco tamponado y dopado con 100 µg/L de 2-MIB y GM y de los estándares internos IB y DHN, con la nueva rampa optimizada. En un análisis conjunto de THMs con 2-MIB y GM, aparecen los cuatro THMs en los primeros 7 min: triclorometano (TCM t_r 2,03 min), bromodiclorometano (BDCM t_r 2,98 min), dibromoclorometano (DBCM t_r 4,90 min) y tribromometano (TBM t_r 6,92 min).

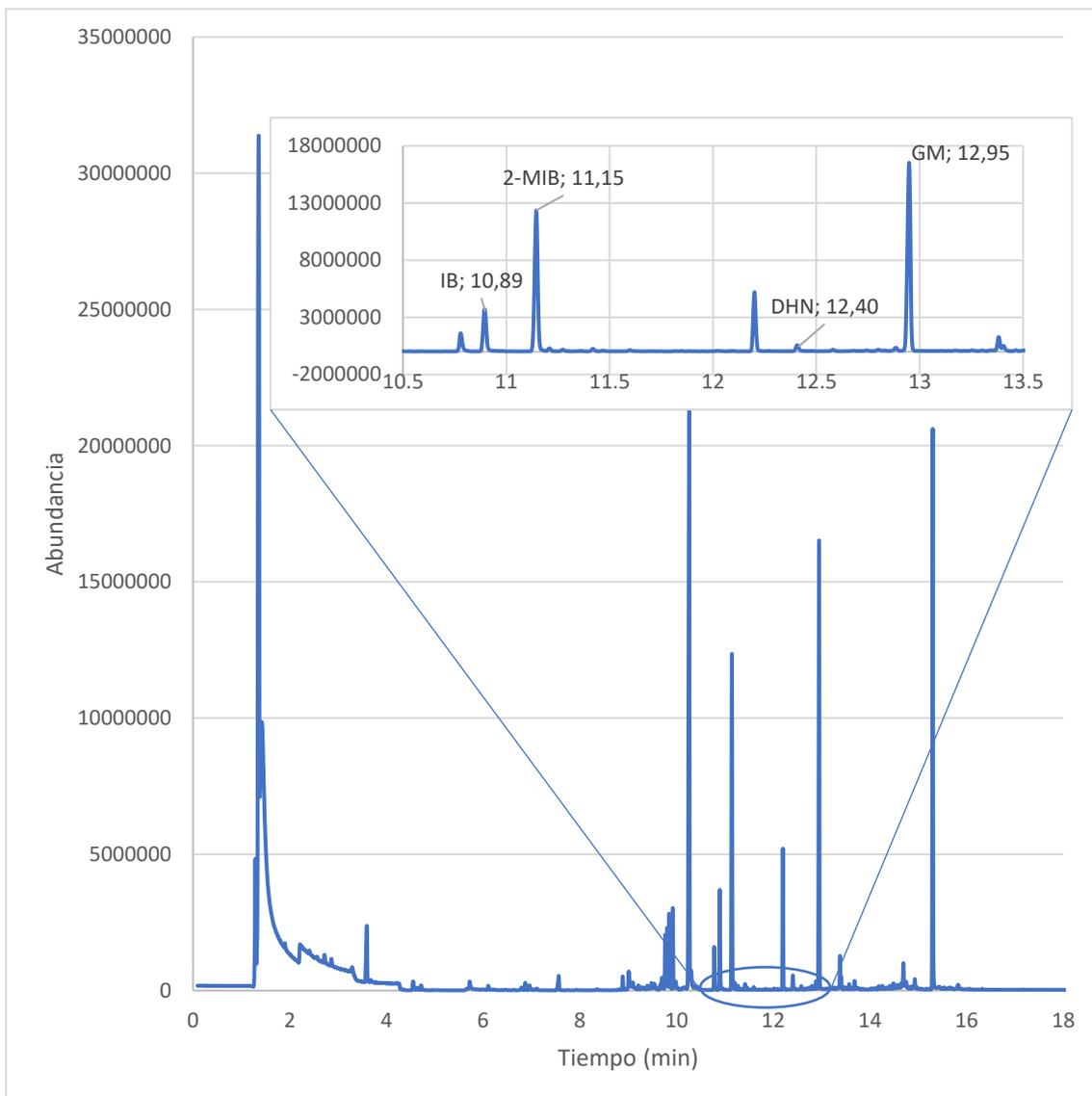


Figura 14.- Cromatograma en modo SCAN de un blanco tamponado y dopado con 100 $\mu\text{g/L}$ de Isoborneol ($t_r = 10,89$ min.), 2-metilisoborneol ($t_r = 11,15$ min.), cis-decahidro-1-naftol ($t_r = 12,40$ min.) y Geosmina ($t_r = 12,95$ min.).

4.1.1. Selección de los iones m/z de los analitos e IS

Los compuestos se identificaron gracias a la biblioteca de espectros de masas que incorpora el propio equipo, Figura 15. Los tiempos de retención y los iones m/z de cada analito y estándar interno se recogen en Tabla 4.

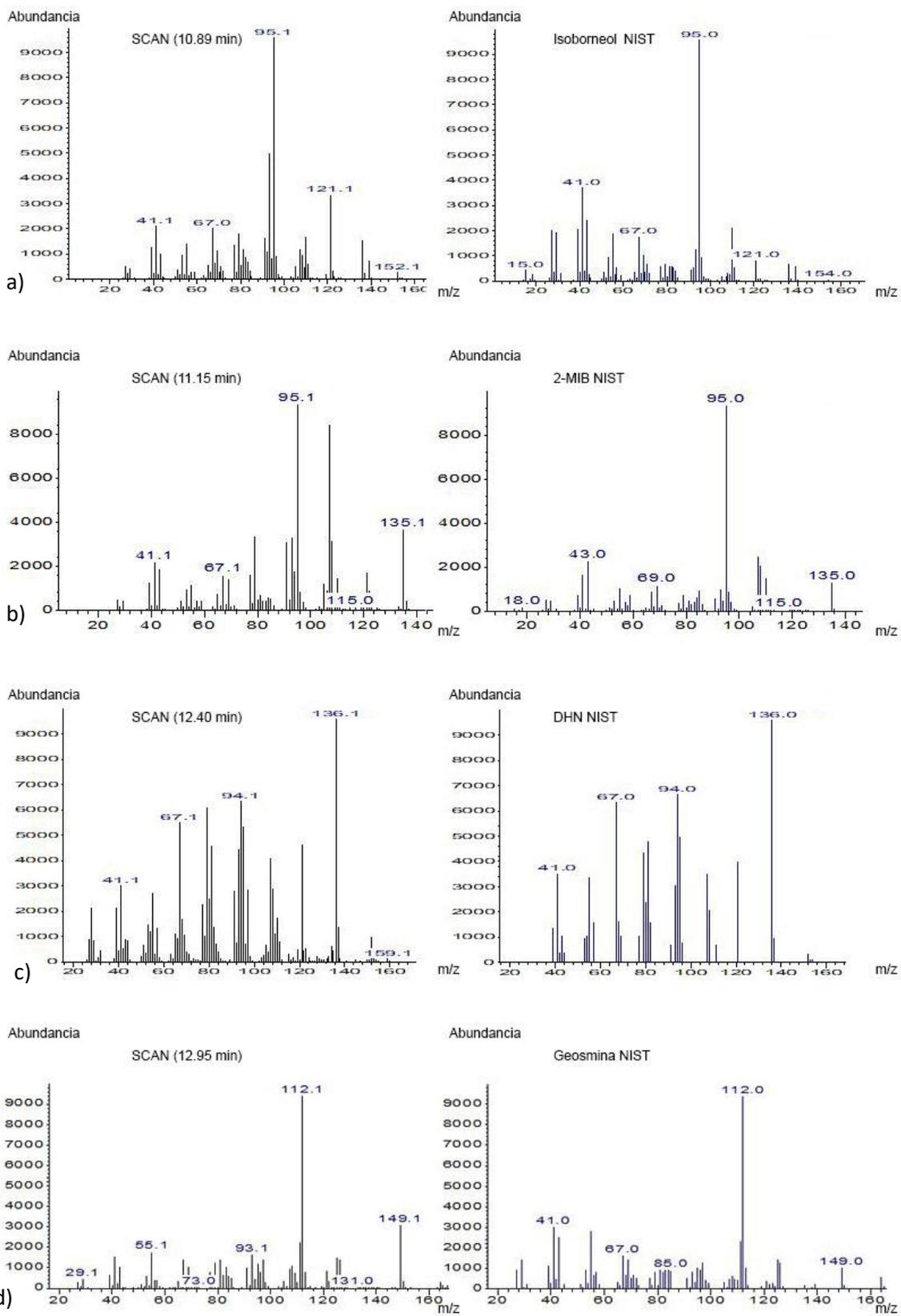


Figura 15.- Espectros de masas correspondientes a los analitos y IS y los obtenidos mediante biblioteca NIST11 para a) IB b) 2-MIB c) DHN y d) GM.

Tabla 4. Tiempos de retención e iones m/z de identificación y cuantificación (en negrita) de los analitos y estándares internos.

Analito	t _r (min)	Ion m/z
IB	10,89	95 , 110, 121
2-MIB	11,15	95, 107 , 135
DHN	12,40	94, 121, 136
GM	12,95	111, 112 , 125

4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO HS-SPME-GC/MS

4.2.1. Intervalo lineal

Como se puede observar en la Figura 16, las curvas de calibración, área del analito/área del IS frente a la concentración del analito, son lineales en todo el intervalo de concentraciones ensayado con coeficientes de regresión superiores al exigido por la EPA de 0,99. Además, cumple con el requerimiento de %RSD<20% para todos los puntos del calibrado, obteniendo un 11,9% para 2-MIB y 17% para GM.

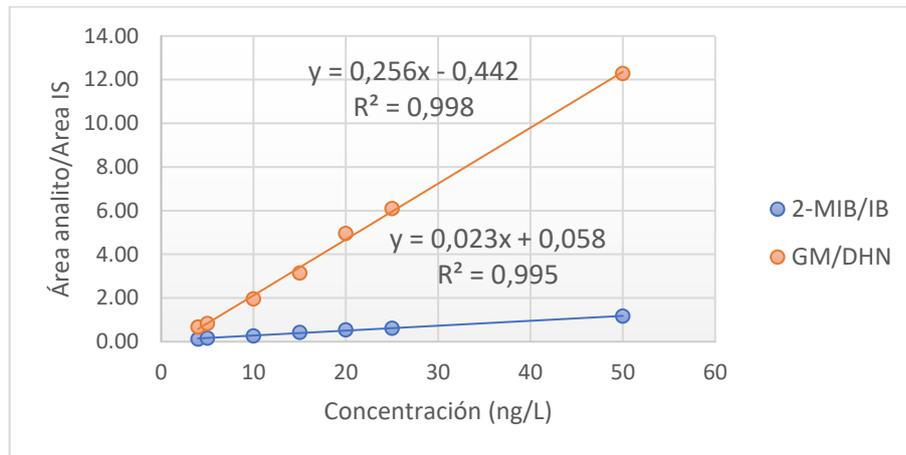
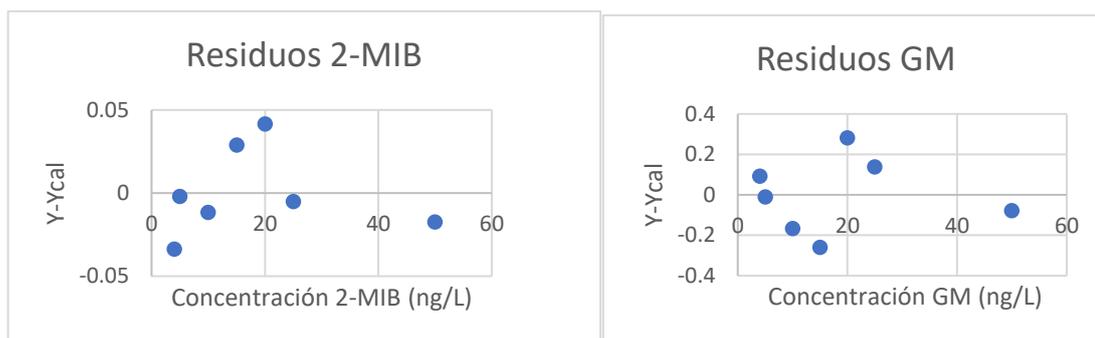


Figura 16.- Variación del área corregida del pico cromatográfico de la GM y el 2-MIB con la concentración (4 – 50 ng/L).

Como se observa en la Figura 17, los residuos de las rectas de calibrado en ningún caso presentan una tendencia positiva o negativa respecto a la línea central, es decir, presentan aleatoriedad. Además, son homocedásticos, es decir, la dispersión es independiente de la concentración.



a)

b)

Figura 17.- Residuales para las curvas de calibración a) 2-MIB y b) GM.

4.2.2. Límites de detección y cuantificación

En la Tabla 5 se muestran los valores del LOD y LOQ estimados para cada analito aplicando las expresiones (2) y (3). Los LLOQ calculados se encontraban fuera del rango de aceptación de una recuperación entre 80-120% establecida por la guía de validación EPA, por lo que se prepararon disoluciones de concentración más alta y se comprobó el criterio de aceptación, estableciendo el LLOQ en una concentración de 5 ng/L para ambos analitos.

Tabla 5. Valores de LOD y LOQ estimados para cada analito.

	[2-MIB] (ng/L)	[GM] (ng/L)
LOD	1,3	2,6
LOQ	2,0	4,1

4.2.3. Selectividad

Como se puede observar en la Figura 18, no existen picos interferentes a los tiempos de retención de los analitos ni de los IS. El área de los picos cromatográficos correspondientes al blanco a los tiempos de retención de los analitos es inferior al 50% del valor de la señal a los niveles de concentración del LLOQ (5 ng/L), Tabla 6, por lo que se puede afirmar que el método analítico es selectivo para la matriz agua.

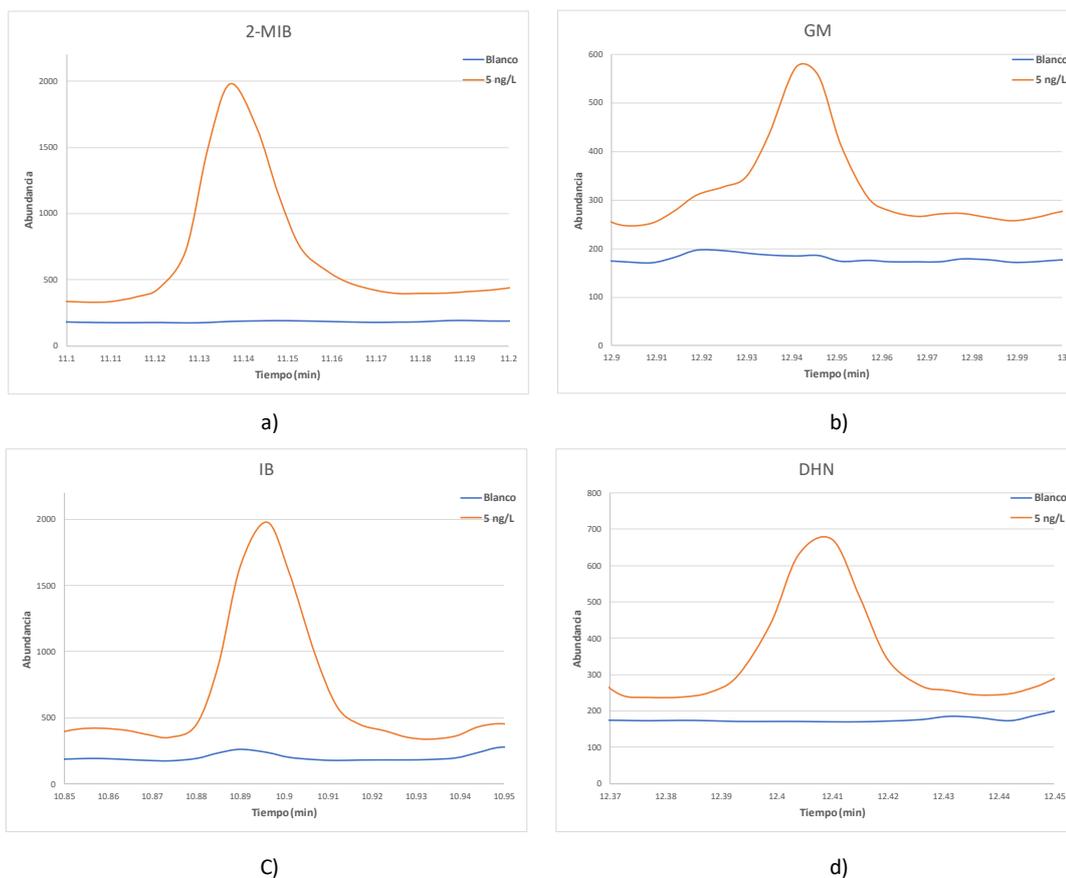


Figura 18.- Cromatogramas de: un blanco (línea azul) y de una disolución de una concentración de 5 ng/L (línea naranja) de a) 2-MIB b) GM c) IB d) DHN. Condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 3.

Tabla 6. Áreas cromatográficas al tiempo de retención de cada analito de un blanco y de una disolución de 5 ng/L.

	2-MIB	GM
Área promedio blancos	44,3	100,8
Área LLOQ (5 ng/L)	1543	1487

4.2.4. Carry-Over

Se comprueba que no aparecen picos cromatográficos a los tiempos de retención de los analitos e IS al inyectar un blanco tras la inyección de una disolución estándar de 50 ng/L de 2-MIB y GM, 100 ng/L de IB y 250 ng/L de DHN, Figura 19. Por lo que se concluye que no existe carry-over.

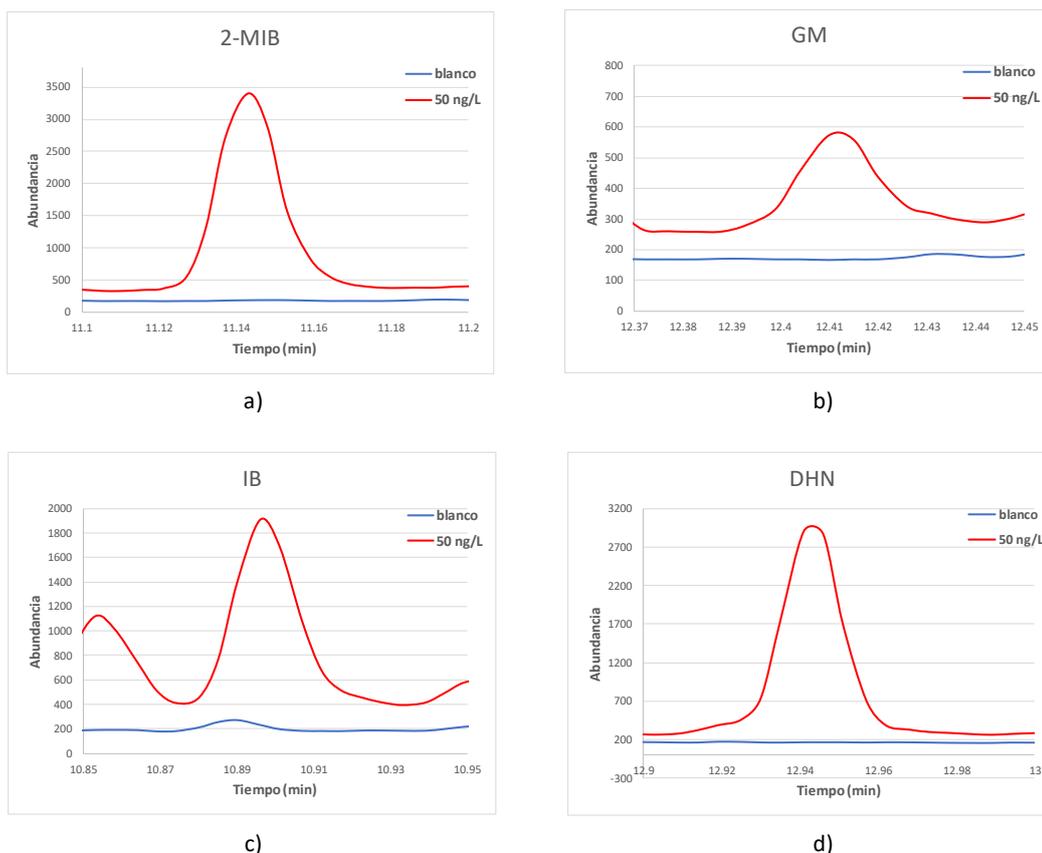


Figura 19.- Cromatogramas de una dilución 50 ng/L de los analitos (rojo) y los IS; y el blanco inyectado posteriormente (azul) para a) 2-MIB b) GM c) IB d) DHN

4.2.5. Efecto Matriz

En la Tabla 7 se recogen las áreas corregidas de los picos cromatográficos obtenidas para tres muestras dopadas con 10 ng/L de 2-MIB y GM: un blanco, un agua de consumo y la muestra de agua diluida. No hay diferencias significativas en los valores obtenidos para el blanco y la matriz de la muestra al ser el %desviación menor del 20%, por lo que se demuestra que no hay influencia de la matriz en las señales analíticas.

Tabla 7: Áreas cromatográficas corregidas de: un blanco, un agua de consumo y un agua de consumo dopadas con 10 ng/L de 2-MIB y GM y con 100 ng/L de IB y 250 ng/L de DHN.

	Área 2-MIB/Área IS	Área GM/Área IS
Blanco dopado	0,19	1,17
Agua de consumo	0,18	1,28
Agua de consumo diluida	0,20	1,32
%Desv. Est.	1	8

4.2.6. Veracidad y Repetitividad

En las Tablas 8 y 9 se recogen los valores de porcentaje de recuperación (%R) y de %RSD obtenidos en el estudio de la veracidad y repetitividad del método analítico para tres concentraciones distintas de los analitos, en el día y entre días. Se evaluaron ambos parámetros teniendo en cuenta la vida media de la fibra del SPME. Por ello se realizaron inyecciones con la fibra nueva (t_0), en el primer día de análisis, con la fibra en la mitad de su vida media ($t_{1/2}$), en el segundo día de análisis y al final de su vida útil (t_2), en el tercer día de análisis.

Tabla 8. Valores de %R obtenidos en el estudio de veracidad para 2-MIB y GM para tres niveles de concentración, en el día y entre días.

Concentración 2-MIB y GM (ng/L)	Estado de la fibra de SPME	Veracidad en el día %R		Veracidad entre días %R	
		2-MIB	GM	2-MIB	GM
5	t_0	102,2	96,8	96,7	96,3
	$t_{1/2}$	96,7	88,5		
	t_2	91,4	103,7		
10	t_0	97,2	98,8	99,0	103,0
	$t_{1/2}$	93,2	105,3		
	t_2	106,5	105,0		
25	t_0	94,7	96,2	96,4	94,8
	$t_{1/2}$	101,5	92,0		
	t_2	93,2	96,4		

Tabla 9. Valores de %RSD obtenidos en el estudio de repetitividad para 2-MIB y GM para tres niveles de concentración, en el día y entre días.

Concentración 2-MIB y GM (ng/L)	Estado de la fibra de SPME	Repetitividad en el día %RSD		Repetitividad entre días %RSD	
		2-MIB	GM	2-MIB	GM
5	t_0	2,6	2,2	12,5	7,8
	$t_{1/2}$	19,6	12,1		
	t_2	13,2	4,0		
10	t_0	3,3	6,3	6,9	3,6
	$t_{1/2}$	11,4	7,8		
	t_2	2,7	8,0		
25	t_0	1,3	1,1	4,6	2,6
	$t_{1/2}$	4,8	5,7		
	t_2	5,8	4,8		

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que el método es veraz y reproducible y por tanto exacto, ya que todas las medidas cumplen los criterios establecidos por la guía de validación SANTE, proporcionando %R entre 80-120% y %RSD por debajo del 20% .

Como era de esperar, los valores más altos de %RSD se obtienen para una concentración de 5 ng/L, correspondiente al LLOQ. Así mismo la vida útil de la fibra tiene una influencia en la repetitividad, una fibra nueva proporciona valores de %RSD más bajos.

Por último, se realizó un test ANOVA (análisis de varianza de un factor), Tabla 10, para evaluar si hay diferencias significativas en las áreas obtenidas por efecto del tiempo de vida útil de la fibra.

Tabla 10. Test ANOVA aplicado a los valores de la señal obtenida para los diferentes tiempos de vida útil de la fibra a tres niveles de concentración de 2-MIB y GM.

Concentración de 2-MIB y GM (ng/L)	F calculada		F crítica
	2-MIB	GM	
5	0,40	3,83	4,46
10	2,73	0,75	
25	4,00	1,28	

Como se puede observar, los valores de $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$ con lo que se puede considerar cierta la hipótesis de que no hay diferencias entre las varianzas de los diferentes grupos: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k = \mu$. Se puede concluir que los valores obtenidos con la fibra a distintos tiempos de vida útil son comparables entre sí.

4.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO A MUESTRAS DE AGUA

Las muestras de agua analizadas presentan unos niveles de concentración de 2-metilisoborneol y Geosmina por debajo del LLOQ (5 ng/L), tanto para las muestras diluidas como sin dilución previa. Estos resultados pueden atribuirse a las bajas temperaturas existentes en el periodo en que se recogieron las aguas ($T < 3^\circ\text{C}$), lo que dificulta la proliferación de las algas responsables de la producción de los analitos de interés, que precisa temperaturas más altas.

A la vista de estos resultados, se monitorizó agua recogida directamente del río Aguera (Guriezo, Cantabria) así como de un manantial subterráneo (Guriezo, Cantabria) para comprobar si la concentración de las algas, y por consiguiente la de los analitos, era superior, al ser aguas no tratadas. La concentración obtenida para estas muestras también fue menor al LLOQ.

Las bajas concentraciones encontradas de estos dos compuestos en las diferentes aguas analizadas, garantiza la inexistencia de cambios en las propiedades organolépticas de las aguas analizadas y por tanto la calidad de las mismas en los períodos analizados.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

1. El método analítico HS-SPME-GC/MS optimizado y validado, bajo las guías de validación EPA y SANTE para la determinación de 2-metilsoborneol y geosmina en aguas de consumo, presenta un intervalo lineal de concentración de 5 – 50 ng/L, una repetitividad en el día y entre días comprendida entre 1,1 y 19,6% en términos de %RSD y una veracidad en términos de %R entre 88,5 y 106,5 %, una buena selectividad, además de no observarse ni carry-over, ni efecto matriz.
2. El método analítico HS-SPME-GC/MS permite la cuantificación de 2-MIB y GM en muestras de agua de consumo que se encuentren a una concentración mínima de olor estimada según bibliografía en 10 ng/L. Así mismo, este método analítico es capaz de determinar de forma simultánea los THMs (productos de desinfección) y 2-MIB y GM (causantes de la modificación de las propiedades organolépticas) en una muestra de agua diluida a la mitad.
3. Todas las muestras de agua de consumo analizadas presentan una concentración por debajo del LLOQ (5 ng/mL), probablemente debido a la estación fría en el que se realizó el muestreo del agua (octubre-diciembre de 2021), dificultando así el crecimiento de las algas responsables de la síntesis de los compuestos de interés, con lo que no se han visto alteradas las propiedades organolépticas del agua.

6. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

A la vista de las conclusiones obtenidas en el análisis de las muestras, la futura investigación de este trabajo va encaminada a analizar muestras de agua de consumo en otros periodos del año más cálidos.

Por otra parte, sería de gran interés ampliar la aplicabilidad del método HS-SPME-GC/MS desarrollado y validado para la determinación de 2-MIB, GM y de THMs³⁷ en muestras de agua de consumo, al análisis de otros compuestos orgánicos volátiles de interés medioambiental en el mismo tipo de matriz.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Marín, Z. R. *Elementos de Nutrición Humana*, EUNED, 1998.
2. Water. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water> (último acceso 17/02/2022).
3. Srinivasan, R.; Sorial, G. A. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. *J. Environ. Sci.*, **2011**, 23 (1), 1-13.
4. World Health Organization. Management of cyanobacteria in drinking-water supplies: Information for regulators and water suppliers, 2015.
5. Jüttner, F.; Watson, S. B. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 4395-4406.
6. Dairi, T. *Comprehensive Natural Products II*; Isoprenoid in Actinomycetes; Elsevier: Oxford, 2010; pp 789-814.
7. BOE-A-2003-3596. Agencia estatal Boletín Oficial del Estado. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/02/07/140/con> (último acceso 17/02/2022)
8. Ciclo del agua – Potabilización. Consorcio de Aguas de Bilbao Bizkaia. <https://www.consorciodeaguas.eus/web/CicloAgua/ciclodelagua.aspx?id=potabilizacion> (último acceso 17/02/2022).
9. Kim, T.; Moon, B.; Kim, T.; Kim, M.; Zoh, K. Degradation mechanisms of geosmin and 2-MIB during UV photolysis and UV/chlorine reactions. *Chemosphere*, **2016**, 162, 157-164.
10. Rodríguez, F. J. *Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización*, Ediciones Díaz de Santos, España, 2003.
11. Yuan, B.; Xu, D.; Li, F.; Fu, M. Removal efficiency and possible pathway of odor compounds (2-methylisoborneol and geosmin) by ozonation. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, 117, 53-58.
12. Mustapha, S.; Tijani, J. O.; Ndamitso, M. M.; Abdulkareem, A. S.; Shuaib, D. T.; Mohammed, A. K. A critical review on geosmin and 2-methylisoborneol in water: sources, effects, detection, and removal techniques. *Environ. Monit. Assess.* **2021**, 193, 1-34.
13. Conrady, M. W.; Bauer, M.; Jo, K. D.; Crokek, D. M.; Busby, R. R. Solid-phase microextraction (SPME) for determination of geosmin and 2-methylisoborneol in volatile emissions from soil disturbance. *Chemosphere*, **2021**, 284, 131333.

14. Ma, X.; Gao, N.; Chen, B.; Li, Q.; Zhang, Q.; Gu, G. Detection of geosmin and 2-methylisoborneol by liquid-liquid extraction-gas chromatograph mass spectrum (LLE-GCMS) and solid phase extraction-gas chromatograph mass spectrum (SPE-GCMS). *Front. Environ. Sci. Eng. China*, **2007**, *1*, 286-291.
15. Salemi, A.; Lacorte, S.; Bagheri, H.; Barceló, D. Automated trace determination of earthy-musty odorous compounds in water samples by on-line purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1136*, 170-175.
16. Parinet, J.; Rodriguez, M. J.; Serodes, J.; Proulx, F. Automated analysis of geosmin, 2-methyl-isoborneol, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine and 2,4,6-trichloroanisole in water by SPME-GC-ITDMS/MS. *International journal of environmental analytical chemistry*, **2011**, *91*, 505-515.
17. Saito, K.; Okamura, K.; Kataoka, H. Determination of musty odorants, 2-methylisoborneol and geosmin, in environmental water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1186*, 434-437.
18. Cortada, C.; Vidal, L.; Canals, A. Determination of geosmin and 2-methylisoborneol in water and wine samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 17-22.
19. Jeleń, H. H.; Majcher, M.; Zawirska-Wojtasiak, R.; Wiewiórowska, M.; Wąsowicz, E. Determination of Geosmin, 2-Methylisoborneol, and a Musty-Earthy Odor in Wheat Grain by SPME-GC-MS, Profiling Volatiles, and Sensory Analysis. *J. Agr. Food Chem.* **2003**, *51*, 7079-7085.
20. Nakamura, S.; Daishima, S. Simultaneous determination of 22 volatile organic compounds, methyl- tert-butyl ether, 1,4-dioxane, 2-methylisoborneol and geosmin in water by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *548*, 79-85.
21. 2-methylisoborneol, TGSC Information System
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1384871.html> (último acceso 17/02/2022).

22. Geosmin, TGSC Information System
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1557961.html> (último acceso 17/02/2022).
23. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principios de Análisis Instrumental. McGraw Hill Interamericana de España SL. 2001.
24. Izaguirre, G.; Wolfe, R. L.; Means III, E. G. Degradation of 2-methylisoborneol by aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2424-2431.
25. Braga, G. S.; Lieberzeit, P. A.; Fonseca, F. J. Molecularly imprinted polymer based sensor to detect isoborneol in aqueous samples. *Procedia Engineer*, **2016**, *168*, 448-451.
26. Bristow, R. L.; Young, I. S.; Pemberton, A.; Williams, J.; Maher, S. An extensive review of the extraction techniques and detection methods for the taste and odour compound geosmin (trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol) in water. *TRAC-Trend. Anal. Chem.* **2019**, *110*, 233-248.
27. Ingeniería de procesos térmicos, Extracción, Gunt Hamburg.
https://www.gunt.de/images/download/extraction_spanish.pdf (último acceso 17/02/2022).
28. Pereira, F. P. *Miniaturization in sample preparation*; De Gruyter Open Poland: 2014
29. Sparkman, O. D.; Penton, Z. E.; Kitson, F. G. Chapter 2 - Gas Chromatography. In *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Second Edition)*. Academic Press: Amsterdam, 2011; pp 15-83.
30. Maranata, G. J.; Surya, N. O.; Hasanah, A. N. Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. *Heliyon*, **2021**, *7*(1), e05934.
31. Cheng, S. Development of a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) procedure for the determination of short-chain fatty acids (SCFAs) in activated sludge by GC-FID. Master's Theses and Doctoral Dissertations. 250. 2009
32. Cromatografía de gases: cómo funciona, tipos, partes, usos, Lifer.
<https://www.lifeder.com/cromatografia-de-gases/> (último acceso 17/02/2022).
33. Karasek, F. W.; Clement, R. E. Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques; Elsevier: 2012; pp 5-41.
34. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014).

35. U.S. EPA. 2006. "Method 8260D (SW-846): Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)," Revision 3. Washington, DC.
36. SANTE/12682/2019. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
37. Santamaría, A. Determinación de trihalometanos, productos derivados de la desinfección, en aguas de consumo, TFG, UPV-EHU, Vizcaya, España, 2021.