

Trabajo Fin de Grado

**Determinación de contaminantes emergentes
empleando técnicas de microextracción y
cromatografía de gases**

Grado en Farmacia

Tutora: Verónica Pino Estévez
Co-tutora: María Providencia González Hernández

Paula Huerta Vidal
Curso 2017-2018

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras, Verónica Pino Estévez y Providencia González Hernández, por su dedicación plena, su esfuerzo en ayudarme a comprender cualquier duda planteada y por compartir conmigo todos los conocimientos necesarios para poder realizar este Trabajo de Fin de grado.

También al Grupo de Investigación de Química Analítica Agroalimentaria y Media Ambiental, por su apoyo y diversión en los días de trabajo en el laboratorio, haciéndolo todo más fácil y ameno.

Quiero agradecer también a mis compañeros del Grado de Farmacia y amigos que con los que he podido realizar este largo camino, en el que un aliento y unas risas han sido de gran ayuda.

Por último, y no menos importante, a mi familia y especialmente a mis padres. Sin su cariño, comprensión y apoyo incondicional, esto hubiera sido imposible.

¡Gracias de verdad!

Abstract

The analytical determination of emerging contaminants, normally present at trace levels in environmental samples, requires extraction and/or preconcentration techniques as a prior step to the chromatographic analysis, to have adequate sensitivity while avoiding matrix effects. Trends in Analytical Chemistry focus on the development of miniaturized and fast methods with adequate performance, to follow green chemistry principles. Among these trends, microextraction techniques, particularly those using novel materials such as metal-organic frameworks (MOFs) as sorbents, merit citation. MOFs are crystalline materials with impressive surface areas.

This study reports the development of a new green analytical method for eight personal care products (PCPs) in environmental waters. PCPs are emerging contaminants included in gels, lotions, and cosmetics. The microextraction method selected was miniaturized dispersive solid-phase extraction (D- μ SPE), using as novel material the MOF CIM-81, followed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). The developed GC-MS method was optimized and validated, allowing the separation and quantification of all PCPs in less than 15 min with excellent reproducibility. Several variables that have influence in the D- μ SPE procedure were studied, with emphasis in the compatibility of the eluates with GC-MS. Optimum conditions only required 20 mg of the MOF CIM-81 and overall sample preparation times \sim 15 min.

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1. Contaminantes emergentes</i>	2
<i>1.2. Productos de cuidado personal (PCPs)</i>	2
<i>1.3. Metodologías de extracción y preconcentración</i>	6
<i>1.4. Nuevos materiales en extracción en fase sólida</i>	6
<i>1.4.1. Redes metal-orgánicas (MOFs)</i>	7
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	9
CAPÍTULO 3. EXPERIMENTAL	11
<i>3.1. Reactivos, material y disoluciones</i>	12
<i>3.2. Instrumentación y equipos</i>	15
<i>3.3. Procedimientos optimizados</i>	15
<i>3.3.1. Síntesis del MOF</i>	15
<i>3.3.2. Procedimiento de D-μSPE</i>	16
<i>3.3.3. Procedimiento cromatográfico</i>	16
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
<i>4.1. Síntesis y caracterización del MOF</i>	18
<i>4.2. Método cromatográfico</i>	18
<i>4.3. Optimización del método D-μSPE</i>	23
<i>4.3.1. Optimización del proceso de elución del método D-μSPE</i>	23
<i>4.3.2. Optimización de la cantidad de MOF</i>	27

CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	32
GLOSARIO.....	34

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminantes emergentes

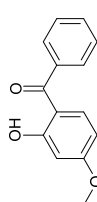
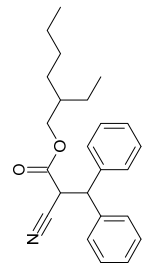
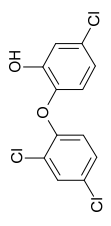
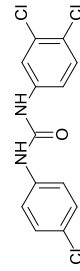
El término “contaminantes emergentes” son un grupo de compuestos de origen antropogénico, cuya peligrosidad se ha señalado recientemente, de ahí que se utilice el término “emergentes” en contraposición a los conocidos contaminantes convencionales y persistentes en el medioambiente [1]. Algunos contaminantes emergentes son pesticidas, subproductos de desinfección de aguas, determinados productos farmacéuticos y de cuidado personal, etc.

1.2. Productos de cuidado personal (PCPs)

Los productos de cuidado personal (PCPs) se utilizan a diario en las sociedades occidentales, de ahí su creciente presencia en el medio ambiente [2].

La literatura científica clasifica a los seis grupos reconocidos de PCPs con un nombre genérico que incluye a los principales compuestos orgánicos que se usan en los mismos: filtros UV, desinfectantes, conservantes, fragancias musk, repelentes de insectos y siloxanos. La Tabla 4.1. recoge una breve descripción de los grupos de PCPs y ejemplos representativos, junto con sus estructuras químicas y algunas características físico-químicas.

Tabla 1.1. Clasificación de los PCPS y ejemplos representativos.

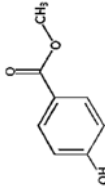
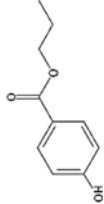
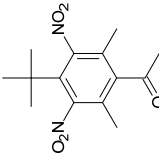
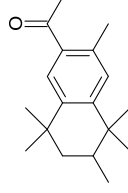
Grupo de PCP	Uso	Comentarios	Ejemplos	Nombre (abreviatura)	Estructura	pK_a^a	$\text{Log}K_{ow}^b$
Filtros UV	Protección contra la radiación UV	<ul style="list-style-type: none"> - Lipófilos - Presentan en sus estructuras anillos aromáticos conjugados - Estables contra la degradación biótica 	benzofenona-3 (BP-3)		7.56	4.00	
			octocrileno (OC)		-	6.89	
Desinfectantes	Impedir el crecimiento de microbios (bacterias, virus, hongos o protozoos)	- Gran persistencia en el medio ambiente	triclosán (TR)		7.80	5.34	
			triclocarbano (TCC)		12.77	6.07	

^a Menos logaritmo de la constante de acidez de los disolventes

^b Coeficiente de reparto octanol/agua

SciFinder Scholar® 2018

Tabla 1.1. (continuación).

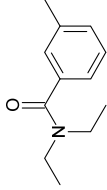
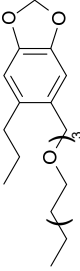
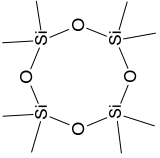
Grupo de PCP	Uso	Comentarios	Ejemplos	Nombre (abreviatura)	Estructura	pK_a^a	$\text{Log}K_{ow}^b$
Conservantes	Evitar el deterioro de los productos cosméticos para aumentar su vida útil	<ul style="list-style-type: none"> - Baja toxicidad - Bajo coste de producción - Se sospecha de su actividad como disruptores endocrinos 		metilparaben (MPB)		8.31	1.88
				propilparaben (PPB)		8.23	2.90
Fragancias musk	Proporcionan olor a los productos de cosmética	<ul style="list-style-type: none"> - Clasificación: musk nitro-aromáticos, musk policíclicos y musk macrocíclicos 		musk cetona (MK)		-	2.51
				tonalida (AHTN)		-	5.06

^a Menos logaritmo de la constante de acidez de los disolventes

^b Coeficiente de reparto octanol/agua

SciFinder Scholar® 2018

Tabla 1.1. (continuación).

Grupo de PCP	Uso	Comentarios	Ejemplos	Nombre (abreviatura)	Estructura	pK_a^a	$\text{Log}K_{ow}^b$
Repelentes de insectos	Impiden la fijación de los insectos en la zona en que son aplicados	– Presentes en una amplia variedad de muestras medioambientales		<i>N,N</i> -dietil- <i>m</i> -toluamida (DEET)		-	2.42
				butóxido de piperonilo (PBO)		-	4.75
Siloxanos	Propiedades suavizantes y humectantes	– Estructuras con cadenas lineales o cíclicas formadas por átomos de silicio y oxígeno alternados, con cadenas hidrocarbonadas enlazadas a los átomos de silicio		octametilciclotetrasiloxano (D4)		-	4.45
		– Hidrofóbicos					
		– Muy persistentes y bioacumulables					

^a Menos logaritmo de la constante de acidez de los disolventes

^b Coeficiente de reparto octanol/agua

SciFinder Scholar® 2018

1.3. Metodologías de extracción y preconcentración

Las recientes metodologías de extracción y preconcentración de contaminantes pretenden cumplir con los principios de la Química Analítica Verde [3], entre lo que pueden citarse: búsqueda de nuevos materiales de extracción de baja toxicidad, disminución o incluso eliminación de disolventes orgánicos clorados durante las estrategias de análisis, miniaturización de los dispositivos de extracción, así como disminución de los residuos generados, costes y tiempos de análisis [4].

Las técnicas de pretratamiento de muestra para la extracción y preconcentración de los contaminantes presentes en las mismas pueden clasificarse en dos grandes grupos según la naturaleza del material extractante: métodos de extracción que emplean un sólido y métodos que emplean un disolvente. Ambas se basan en el reparto favorable de los analitos desde la muestra hasta la fase extractante. Dentro de las técnicas basadas en el uso de extractantes sólidos se puede distinguir entre la microextracción en fase sólida con fibras (SPME) y la extracción en fase sólida miniaturizada (μ SPE).

La μ SPE en su modalidad más utilizada, la dispersiva (D- μ SPE), consiste en la adición de un material sólido, conocido como sorbente (<500 mg), a una muestra de entre 5 y 20 mL, favoreciendo el proceso de reparto mediante la aplicación de vortex o ultrasonidos. Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de elución de los analitos de interés que ha quedado retenido en el material, generalmente usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos (<1 mL), preferentemente que sean compatibles con los equipos cromatográficos.

1.4. Nuevos materiales en extracción en fase sólida

La búsqueda de nuevos materiales para su empleo como sorbentes en metodologías de extracción en fase sólida (SPE), así como en la modalidad D- μ SPE, ha sido uno de los focos de investigación en Química Analítica. Los novedosos materiales hasta ahora aplicados con éxito incluyen: polímeros de impronta molecular [5], nanopartículas metálicas [6], materiales carbonosos [7], y, más recientemente, las redes metal-orgánicas (MOFs, por sus siglas en inglés *Metal-Organic Frameworks*) [8,9].

1.4.1. Redes metal-orgánicas (MOFs)

Los MOFs son materiales sólidos cristalinos tridimensionales formados por la unión de un ion metálico central y un ligando orgánico, generando una red microporosa [10]. La gran versatilidad en la combinación de metales y ligandos permite diseñar un gran número de MOFs, existiendo actualmente más de 20000. Estos novedosos materiales tienen propiedades únicas, tales como porosidad permanente, estructura altamente ordenada, gran área superficial (las máximas descritas), alta estabilidad térmica y mecánica, y densidades cristalinas muy bajas [11].

Los MOFs se han empleado con éxito en el almacenamiento de gases [12], en aplicaciones biomédicas [13], en catálisis [14], o como sensores [15].

Es de destacar el creciente número de trabajos científicos publicados sobre MOFs en Química Analítica en los últimos años, convirtiéndose en uno de los campos de mayor aplicación [8,9]. Particularmente, se están utilizando con éxito como novedosos sorbentes en D- μ SPE [8], para la extracción de contaminantes, tal y como se muestra en la Figura 4.1.

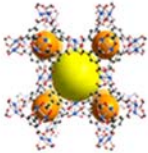
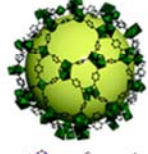
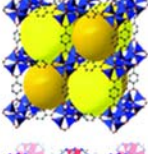

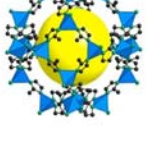
Nombre	Estructura	Metal	Ligando
HKUST-1		Cu(II)	Ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico
MIL-101		Cr(III)	Ácido benceno-1,4-dicarboxílico
MOF-5		Zn(II)	Ácido benceno-1,4-dicarboxílico
UiO-66		Zr(IV)	Ácido benceno-1,4-dicarboxílico
ZIF-8		Zn(II)	2-Metilimidazol

Figura 1.1. MOFs más frecuentes utilizados en Química Analítica como sorbentes en técnicas de extracción y preconcentación.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Los PCPs suponen un riesgo para el medio ambiente y para la salud del ser humano debido a su toxicidad, y por ser incluso disruptores endocrinos. Las metodologías analíticas para su monitorización en el medioambiente deben cumplir, además de con los requisitos legislativos, con los requerimientos de la Química Analítica Verde para asegurar la sostenibilidad medioambiental.

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado es establecer una metodología analítica para la determinación de un conjunto de PCPs (específicamente seis filtros UV, un desinfectante y un repelente de insectos) y su aplicación en el análisis de aguas, haciendo uso de un MOF como novedoso material sorbente en la etapa de extracción y preconcentración. La metodología utilizada para este estudio es la extracción en fase sólida miniaturizada en su modalidad dispersiva (D- μ SPE) seguida de cromatografía de gases y detección por espectrofotometría de masas (GC-MS).

Para alcanzar dicho objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Optimizar y validar un método de GC-MS para la determinación analítica de los PCPs seleccionados.
- Optimizar un conjunto de variables del procedimiento de extracción seleccionado, D- μ SPE, en cuanto al proceso de elución y la cantidad de MOF necesaria, con el fin de mejorar la extracción de los PCPs seleccionados cuando están presentes en agua.

CAPÍTULO 3
EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos, materiales y disoluciones

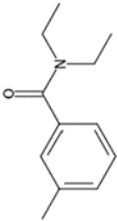
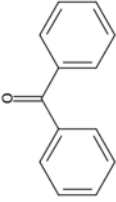
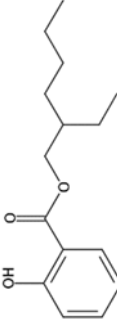
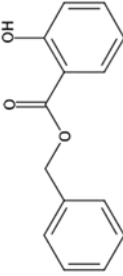
Los analitos estudiados (Tabla 3.1) son DEET, benzofenona (BP), bencil salicilato (BS), 2-etilhexil salicilato (EHS), BP-3, TR, antranilato de metilo (MA) y padimato O (OD-PABA). Las disoluciones estándar se prepararon en acetonitrilo en un rango de concentración entre 1000 y 4136 mg·L⁻¹, y en ciclohexano entre 2040 y 2950 mg·L⁻¹. Las disoluciones de trabajo se obtuvieron por dilución de estas disoluciones estándar.

Los disolventes empleados fueron acetonitrilo, ciclohexano, dimetilformamida y acetona, todos suministrados por Sigma-Aldrich. Para ajustar el pH de la muestra se empleó una disolución tampón acético/acetato (ambos reactivos suministrados por Sigma-Aldrich) de pH 5.

Los reactivos utilizados para sintetizar el MOF CIM-81 fueron nitrato de cinc, 1,2,4-triazol y ácido tereftálico (Sigma-Aldrich). Los reactores para la síntesis del MOF y el autoclave de acero inoxidable fueron suministrados por Parr Instrument Company.

Se utilizaron tubos de centrifuga de Pyrex[®] de 15 mL de capacidad para llevar a cabo las extracciones D- μ SPE. Para filtrar las distintas disoluciones se empleó una jeringa de vidrio Fortuna Optima de 2 mL de Sigma Aldrich y filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Whatman[™] de 0.2 μ m. Los balones utilizados para la evaporación del disolvente en el ratovapor fueron de 20 mL de capacidad. Se utilizaron asimismo viales de 2 mL e insertos de 0.2 mL proporcionados por Agilent Technologies.

Tabla 3.1. Productos de cuidado personal (PCPs) utilizados en el presente trabajo y sus características físico-químicas.

Nombre (abreviatura)	Estructura	Clasificación	PM ^a (g·mol ⁻¹)	pK _a ^b	T _{eb} ^c (°C)	Pureza (%)	Casa comercial
<i>N,N</i> -dietil-mtoluamida (DEET)		Repelente de insectos	191.27	1.37	160.0	97.70	Fluka Analytical
Benzofenona (BP)		Filtro UV	182.22		305.4	99.50	Dr. Ehrenstorfer GmbH
2-etilhexil salicilato (EHS)		Filtro UV	250.33	8.13	331.5	98.00	Sigma Aldrich
Bencil salicilato (BS)		Filtro UV	228.24	8.11	320.0	100	Sigma Aldrich

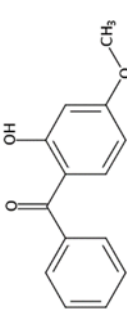
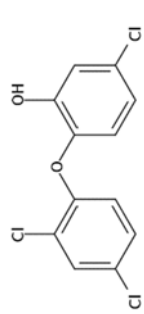
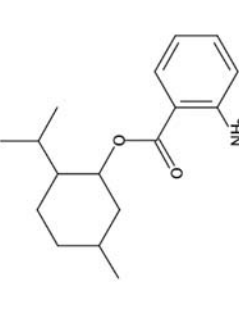
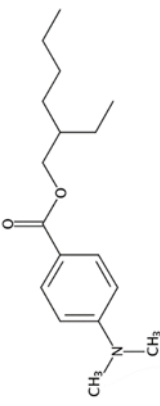
^a Peso molecular

^b Menos logaritmo de la constante de acidez de los compuestos

^c Temperatura de ebullición

SciFinder Scholar® 2018

Tabla 3.1. (continuación)

Nombre (abreviatura)	Estructura	Clasificación	PM ^a (g·mol ⁻¹)	pK _a ^b	T _{eb} ^c (°C)	Pureza (%)	Casa comercial
Benzofenona-3 (BP3)		Filtro UV	228.24	7.56	155	100	Sigma Aldrich
Triclosán (Tr)		Desinfectante	289.54	7.80	50 - 54	99.00	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Antranilato de metilo (MA)		Filtro UV	275.39	2.17	177 - 179	>98.5	Sigma Aldrich
Padimato O (OD-PABA)		Filtro UV	277.4	2.39	382.9	100	Sigma Aldrich

^a Peso molecular^b Menos logaritmo de la constante de acidez de los compuestos^c Temperatura de ebullición

SciFinder Scholar® 2018

3.2. Instrumentación y equipos

Las micropipetas empleadas para la toma de volúmenes fueron suministradas por Eppendorf, con rangos de volúmenes de 0.5–10 μL , 2–20 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL , y 1–10 mL.

El agua ultrapura se obtuvo mediante el sistema de purificación Milli-Q Gradient A10 de Millipore. Un sistema de agitación vortex Reax Top de Heidolph GMBH, una centrífuga de Eppendorf Modelo 5720, un rotavapor IKA[®] modelo RV10 y un baño de ultrasonidos KM de Shenzhen Codyson Electrical se emplearon asimismo en la extracción.

Los patrones de difracción de Rayos X fueron obtenidos en el *Servicio Integrado de Difracción de Rayos X* del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, empleando un difractor X'Pert PRO de Panalytical.

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases modelo 7820A de Agilent Technologies con una columna capilar HP-5ms (30 m de longitud \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μm), también de Agilent Technologies, equipado con un espectrómetro de masas (MS) de Agilent Technologies modelo 5977B que incluía un ionizador de impacto electrónico y un cuadrupolo simple como analizador de masas. Para el control del equipo se utilizó el software “MassHunter Workstation GC/MS Data Acquisition” versión B.07.04, y para la adquisición de los datos se usó el software “MassHunter Workstation Qualitative Analysis” versión B.07.00.

3.3. Procedimientos optimizados

3.3.1. Síntesis del MOF

El MOF CIM-81 fue sintetizado siguiendo el protocolo desarrollado en el grupo de investigación MATMOL de la ULL, mezclando nitrato de cinc, 1,2,4-triazol y ácido tereftálico, respectivamente, en una proporción molar 2:2:1 hasta su completa disolución en dimetilformamida. La síntesis del MOF se llevó a cabo en un horno a 120 $^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Completada la síntesis, el MOF se filtra por gravedad, se lava con acetona, y se

deja secar en estufa a 50 °C. Finalmente, se activa en acetona durante 48 horas, para posteriormente secarlo.

3.3.2. Procedimiento de D- μ SPE

El procedimiento óptimo consiste en añadir 20 mg del MOF CIM-81 a una muestra de 10 mL de agua tamponada a pH 5 conteniendo los analitos de interés. Se aplica a continuación agitación vortex durante 3 minutos para favorecer la extracción de los analitos desde la muestra acuosa hacia el MOF. La muestra se centrifuga durante 3 minutos a $2500 \times g$, y se elimina el sobrenadante. Posteriormente, se añade el disolvente eluyente (500 μ L de metanol) y se aplica nuevamente agitación vortex durante 3 minutos para asegurar la elución de los analitos. El disolvente eluyente se filtra (0.2 μ m) y se evapora completamente en el rotavapor a vacío. Finalmente, se reconstituyen los analitos en el disolvente compatible con el equipo cromatográfico (100 μ L de ciclohexano:acetato de etilo, en un ratio 9:1) aplicando ultrasonidos (1 minuto). El extracto final se transfiere a un vial para su incorporación en el automuestreador del GC-MS.

3.3.3. Procedimiento cromatográfico

El método cromatográfico óptimo consiste en un programa de temperatura que comienza a 70 °C y aumenta a razón de 15 °C \cdot min⁻¹ hasta alcanzar los 300 °C, manteniéndose así durante 5 minutos. El gas portador empleado es helio ultrapuro y el flujo 1 mL \cdot min⁻¹. Las temperaturas de la línea de transferencia, la fuente de ionización y el cuadrupolo del MS son 290, 230 y 150 °C, respectivamente. El sistema de ionización empleado es impacto electrónico (EI) a 70 eV. En las condiciones optimizadas se ha trabajado con monitorización de iones inyectando 2 μ L de extracto (o estándar) en modo *splitless* en el puerto de inyección, a 280 °C, y con un *solvent delay* de 7.5 minutos.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis y caracterización del MOF

El novedoso MOF CIM-81 se preparó en el Laboratorio de Rayos X y Materiales Moleculares (Grupo MATMOL) con el protocolo descrito en el apartado 3.3.1.

Asimismo, los estudios previos realizados por el grupo de investigación han permitido llevar a cabo la caracterización de la estructura cristalina del MOF. En este sentido, se compararon las características del material preparado en este trabajo de investigación con las características que debe reunir de acuerdo con los estudios previos, tal y como se observa en la Figura 4.1.

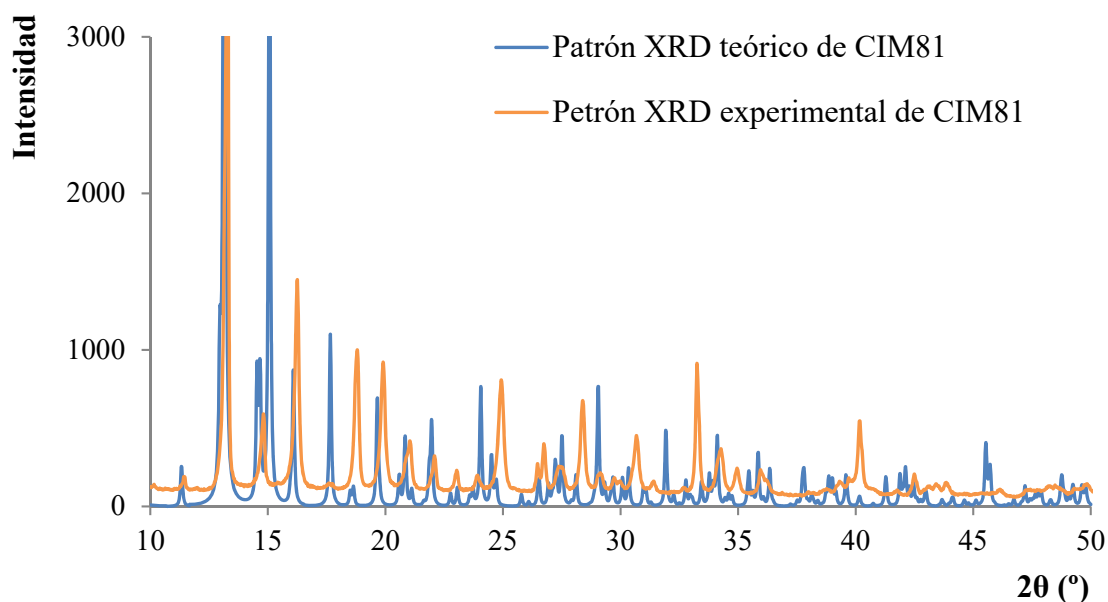


Figura 4.1. Difractograma teórico (azul) y diffractograma experimental (naranja) del MOF CIM-81 sintetizado en este trabajo.

4.2. Método cromatográfico

Para la determinación del grupo de PCPs seleccionado, así como para su correcta extracción de aguas medioambientales, deben establecerse unas condiciones apropiadas

para la separación e identificación de los mismos en el GC-MS con una sensibilidad adecuada.

Tras evaluar diferentes rampas de temperatura en el horno del GC con la columna HP-5ms (apartados 3.2. y 3.3.3.) se obtuvo una adecuada separación de los PCPs.

Para la detección y la cuantificación de los analitos en el MS se trabajó con la monitorización de iones simples (SIM), tal y como se señala en la Tabla 4.1. Los valores de desviaciones estándar (SD) asociados a los tiempos de retención fueron en todo caso <0.009%, lo que muestra la reproducibilidad del método cromatográfico.

La Figura 4.2. muestra un cromatograma representativo de los PCPs, en el cual se observa la adecuada separación alcanzada.

Tabla 4.1. Parámetros de identificación de los PCPs estudiados, y reproducibilidad asociada a los tiempos de retención en el GC-MS.

PCP	$t_R^a \pm SD^b$ (min)	Iones ^c (g·mol ⁻¹)	Segmento
DEET	8.516 ± 0.006	119 , 91, 190	1
BP	8.955 ± 0.002	105 , 182, 77	1
EHS	10.199 ± 0.001	120 , 138, 121	2
BS	10.705 ± 0.005	91 , 65, 92	2
BP3	11.788 ± 0.005	151 , 227, 228	3
TR	12.276 ± 0.007	290 , 288, 218	3
MA	12.309 ± 0.002	137 , 119, 275	3
OD-PABA	13.161 ± 0.009	165 , 148, 164	4

^a Tiempo de retención

^b Desviación estándar asociada a los tiempos de retención (n = 26)

^c Masas de los iones más abundantes en los que se fragmentan los compuestos en el espectrómetro de masas (en negrilla se marcan los iones cuantificadores empleados, y sin resaltar con negrilla se señalan los iones cualificadores empleados)

Los parámetros de calibración analítica para el método cromatográfico optimizado se recogen en la Tabla 4.2. Las curvas de calibración se obtuvieron representando la señal cromatográfica (área de pico) frente a la concentración del PCP (estándares en ciclohexano) para 6 niveles de calibración en un rango de 0.5 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, excepto para BP3, TR y MA cuyo calibrado comenzó en 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Todos los coeficientes de correlación fueron superiores a 0.995, lo cual indica la buena linealidad del método de calibración.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se verificaron a nivel experimental, e indican aquellas concentraciones que proporcionan una señal de 3 y 10 veces el ruido, respectivamente. Así, los LODs oscilaron entre 0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para BP y 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para TR. Por su parte, los LOQs oscilaron entre 0.37 y 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para BP y TR, respectivamente; lo que señala la adecuada sensibilidad del método de GC-MS optimizado.

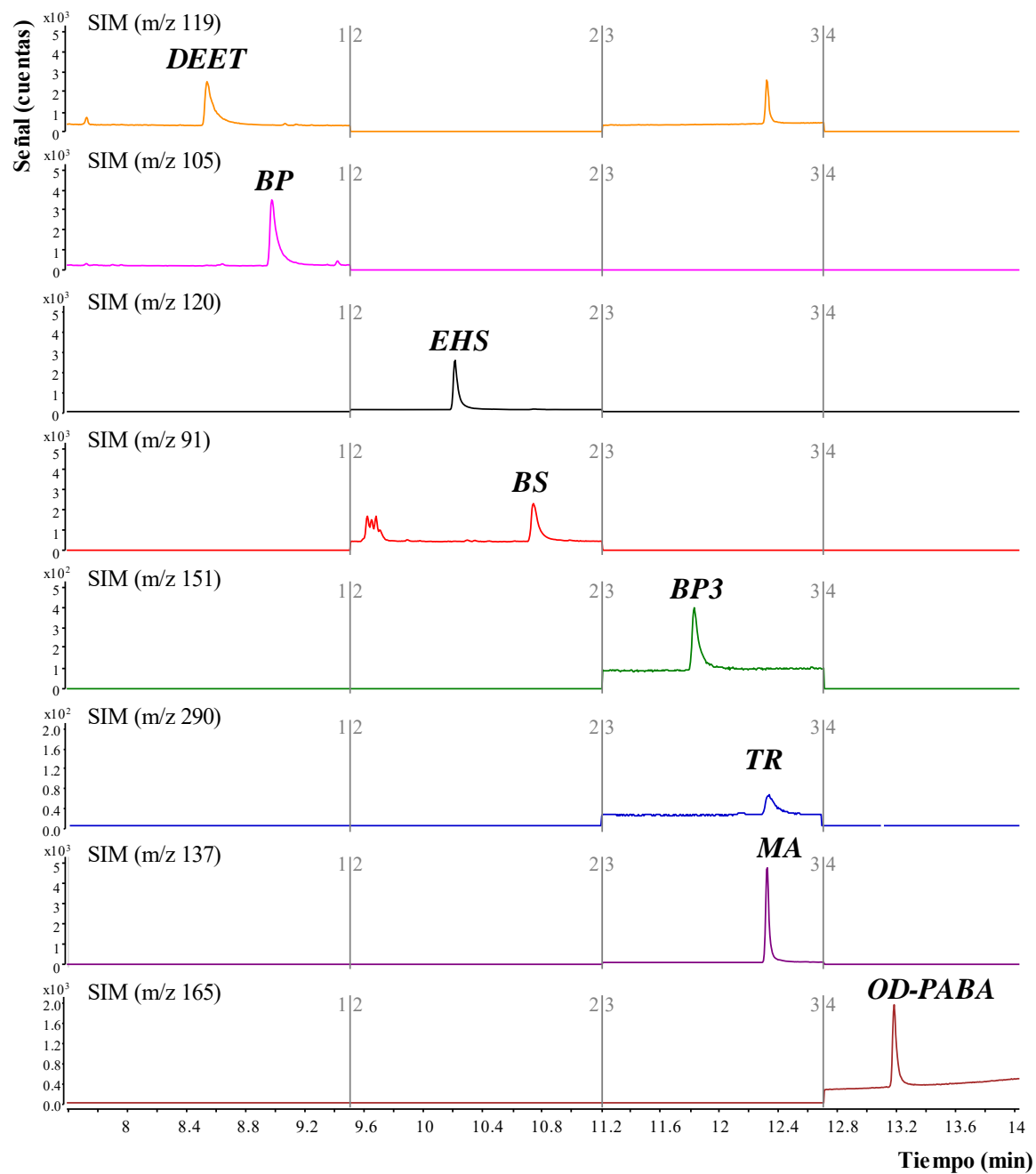


Figura 4.2. Cromatograma representativo de un estándar (en ciclohexano) de PCPs a una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, obtenido en las condiciones óptimas mediante GC-MS.

Tabla 4.2. Parámetros de calidad analítica del método cromatográfico GC-MS para el conjunto de PCPs estudiados.

PCP	R ^a	S _{y/x} ^b	Pendiente ± SD ^c	Ordenada en el origen ± SD ^d	Rango calibración (µg·L ⁻¹)	LOD ^e (µg·L ⁻¹)	LOQ ^f (µg·L ⁻¹)
DEET	0.9993	353	215 ± 4	-85 ± 181	0.5 - 100	0.12	0.40
BP	0.9992	2398	301 ± 5	-1201 ± 1040	0.5 - 100	0.11	0.37
EHS	0.9997	137	122 ± 2	257 ± 70	0.5 - 100	0.14	0.47
BS	0.9984	371	144 ± 4	-80 ± 190	0.5 - 100	0.13	0.43
BP3	0.9986	76	29 ± 1	-43 ± 45	1 - 100	0.21	0.70
TR	0.9950	42	9 ± 1	16 ± 25	1 - 100	0.24	0.80
MA	0.9999	133	167 ± 2	79 ± 79	1 - 100	0.20	0.67
OD-PABA	0.9997	83	75 ± 1	3 ± 42	0.5 - 100	0.14	0.47

^a Coeficiente de correlación^b Desviación estándar de los residuos^c Desviación estándar asociada a la pendiente^d Desviación estándar asociada a la ordenada en el origen^e Límite de detección^f Límite de cuantificación

4.3. Optimización del método D- μ SPE

Una vez sintetizado y adecuadamente caracterizado el MOF CIM-81, y con el método de GC-MS optimizado y parcialmente validado para el grupo de PCPs seleccionado, es importante optimizar la metodología analítica microextractiva D- μ SPE que utiliza este MOF como material de extracción. El esquema de la metodología a optimizar se incluye en la Figura 4.3. En este trabajo, las variables optimizadas fueron: naturaleza y volumen del disolvente de elución en D- μ SPE, así como cantidad óptima de MOF.

4.3.1. Optimización del proceso de elución del método D- μ SPE

El método de D- μ SPE empleando el MOF CIM-81 como sorbente ha sido empleado con éxito en el grupo de investigación para la extracción y preconcentración de un grupo similar de contaminantes, pero utilizando en ese caso cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC). En tales estudios, y para asegurar la compatibilidad con UHPLC, el disolvente empleado en la etapa final de elución de los PCPs fue metanol.

En el presente estudio, la técnica de determinación analítica seleccionada es GC-MS. En ese sentido, es importante seleccionar disolventes de elución compatibles con la fase estacionaria de la columna del GC. En la Tabla 4.3. se muestran las características físico-químicas de los disolventes considerados en este estudio. Cabe señalar que para el empleo de metanol es necesario una etapa adicional de evaporación y reconstitución con un disolvente compatible con el equipo de GC (puesto que el metanol no lo es).

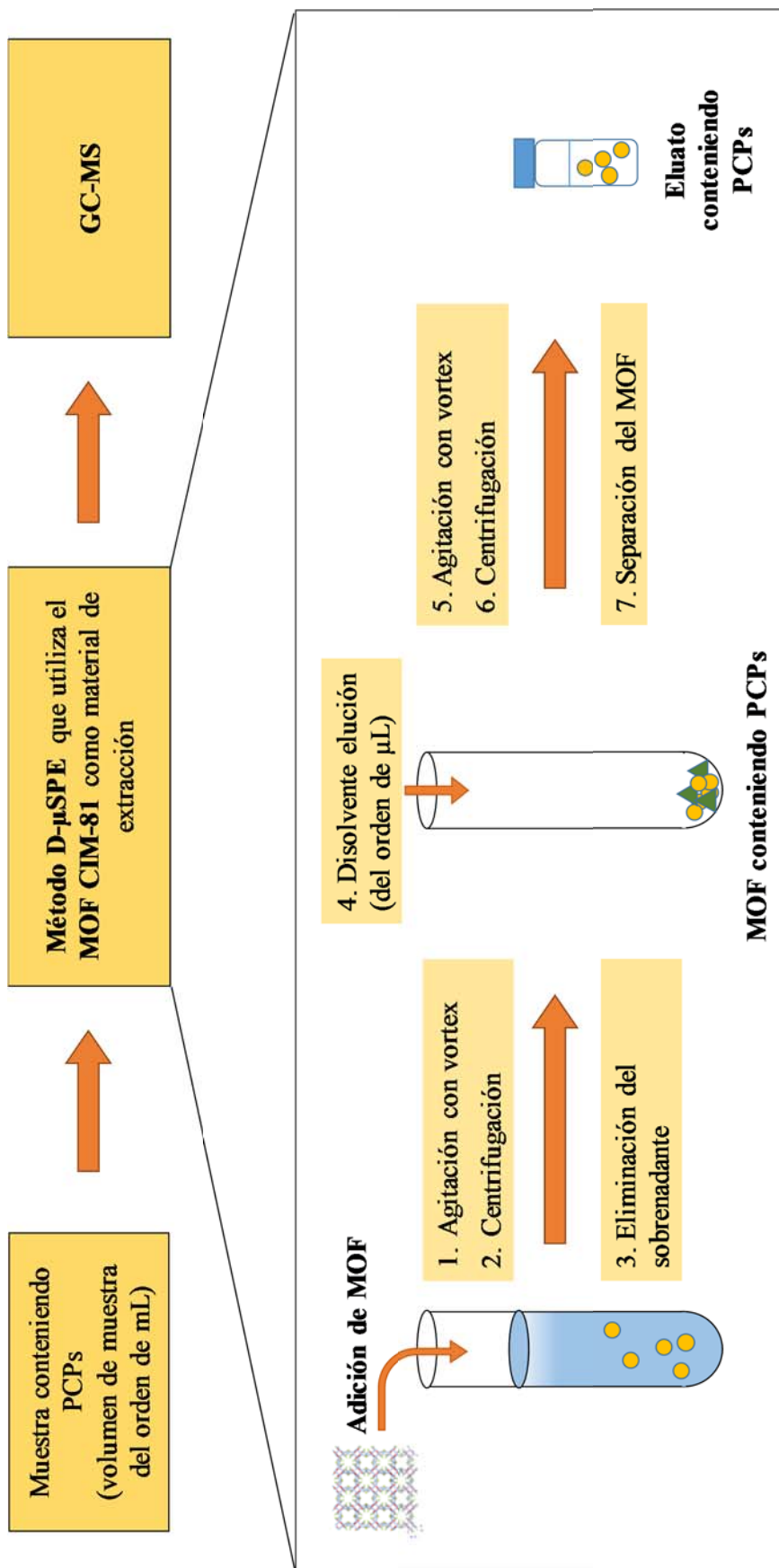


Figura 4.3. Esquema de la metodología D-μSPE considerada para su optimización.

Tabla 4.3. Características físico-químicas de los disolventes eluyentes utilizados.

Disolvente	Log K_{ow} ^a	T_{eb} ^b (°C)	pK_a ^c	Compatible con GC
Metanol	-0.690	64.7	15.17	No
Ciclohexano	3.163	80.7	-	Sí
Acetato de etilo ^d	0.785	77.0	-	Sí

^a Coeficiente de reparto octanol/agua

^b Temperatura de ebullición

^c Menos logaritmo de la constante de acidez de los disolventes

^d Este disolvente se estudió como aditivo en la elución, no como disolvente de elución en sí mismo

Las experiencias realizadas se llevaron a cabo fijando una serie de variables, de acuerdo de los estudios previos del grupo con UHPLC. Así, se emplearon 10 mL de agua ultrapura, tamponada a pH 5, y conteniendo $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los PCPs estudiados, y 20 mg del MOF CIM-81 como sorbente. A continuación, se aplicó vortex durante 3 minutos y se centrifugó durante 3 minutos a $2500 \times g$. Después de eliminar el sobrenadante, se utilizaron $500 \mu\text{L}$ de disolvente ciclohexano y se aplicó 3 minutos de vortex para favorecer la elución de los PCPs. Las recuperaciones obtenidas fueron tan bajas, que se decidió utilizar metanol como disolvente eluyente, y claramente fue necesario para ello su evaporación tras la elución, seguido de reconstitución con $100 \mu\text{L}$ de ciclohexano para, además, incrementar el factor de preconcentración. La Figura 4.4. recoge los resultados obtenidos en estas condiciones, donde se observa claramente la idoneidad del metanol como disolvente de elución (seguido de la etapa de evaporación y reconstitución con ciclohexano).

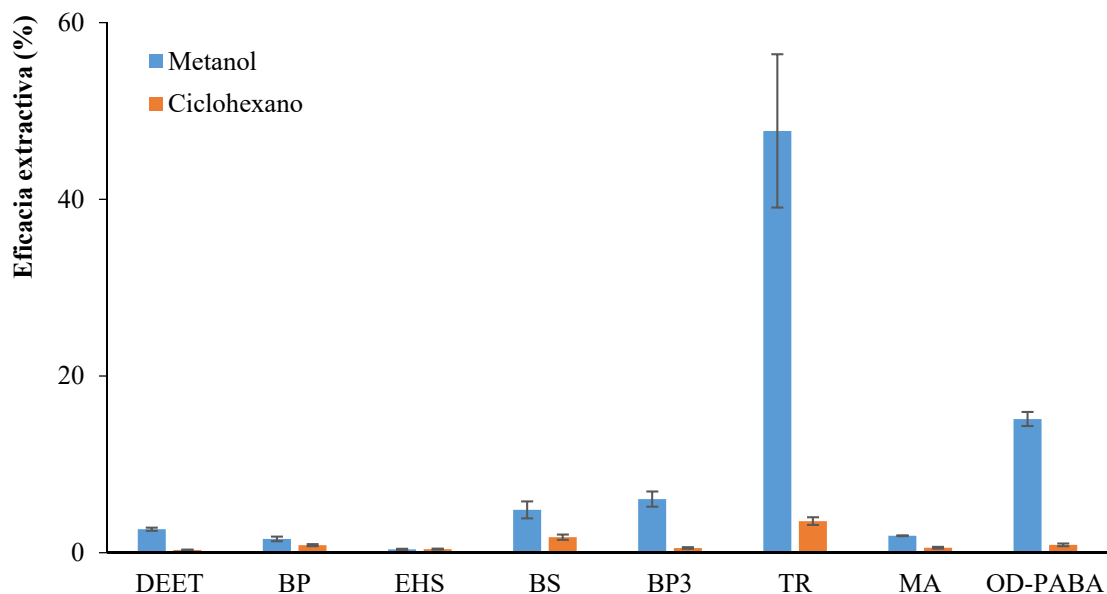


Figura 4.4. Influencia de la naturaleza del disolvente de elución en la eficacia extractiva de los PCPs mediante el método D- μ SPE-GC-MS cuando se utiliza el MOF CIM-81 como extractante.

Con objeto de mejorar la etapa de reconstitución de los PCPs con ciclohexano (tras la elución con metanol), se decidió incorporar un disolvente a modo de aditivo en el ciclohexano, el acetato de etilo, y además en distintas proporciones (Figura 4.5.), con objeto de mejorar la solubilidad de los PCPs en el reconstituyente antes de inyectar en el equipo GC-MS. Las condiciones fijadas fueron las mismas que las anteriormente señaladas. Se observa que el acetato de etilo mejora la recuperación de los PCPs, pero al disminuir el ratio ciclohexano:acetato de etilo se produce una disminución de la señal. Por tanto, la proporción de disolventes seleccionada como óptima fue 90 μ l de ciclohexano y 10 μ l de acetato de etilo.

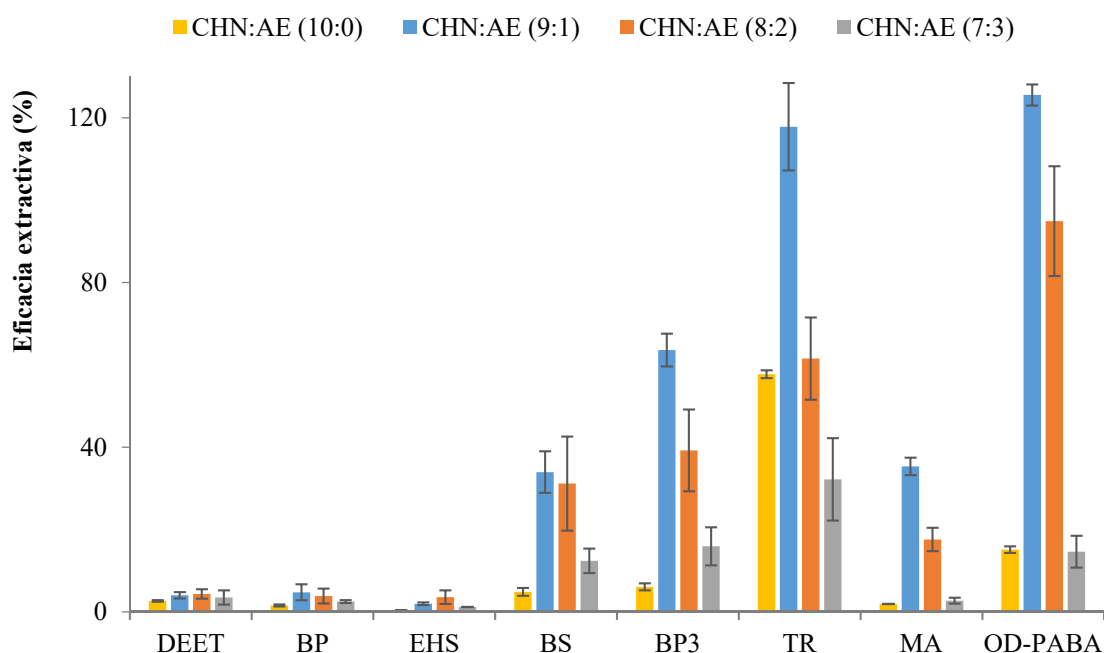


Figura 4.5. Resultados obtenidos de las diferentes proporciones ciclohexano:acetato de etilo (CHN:AE) empleadas en la etapa de reconstitución, y su influencia en la eficacia extractiva de los PCPs mediante D- μ SPE-GC-MS utilizando el MOF CIM-81 como extractante.

4.3.2. Optimización de la cantidad de MOF

Con el objeto de mejorar la eficacia extractiva del método se ha estudiado la cantidad de MOF intentando, al mismo tiempo, no consumir en exceso el material de extracción para cumplir con requisitos de miniaturización y bajos costes. Para las experiencias realizadas en este estudio se fijaron las mismas variables indicadas en el apartado 4.3.1, reconstituyendo los analitos en la etapa final del proceso de microextracción con 100 μ L de ciclohexano:acetato de etilo en un ratio 9:1.

En la Figura 4.6. se recogen los resultados obtenidos empleando 20 mg y 30 mg del MOF CIM-81. Se obtienen mayores recuperaciones del proceso analítico con 20 mg de MOF, probablemente porque usando 30 mg de MOF se requieran volúmenes de disolvente eluyente mayores a los establecidos en el método desarrollado. Por tanto, se seleccionaron 20 mg.

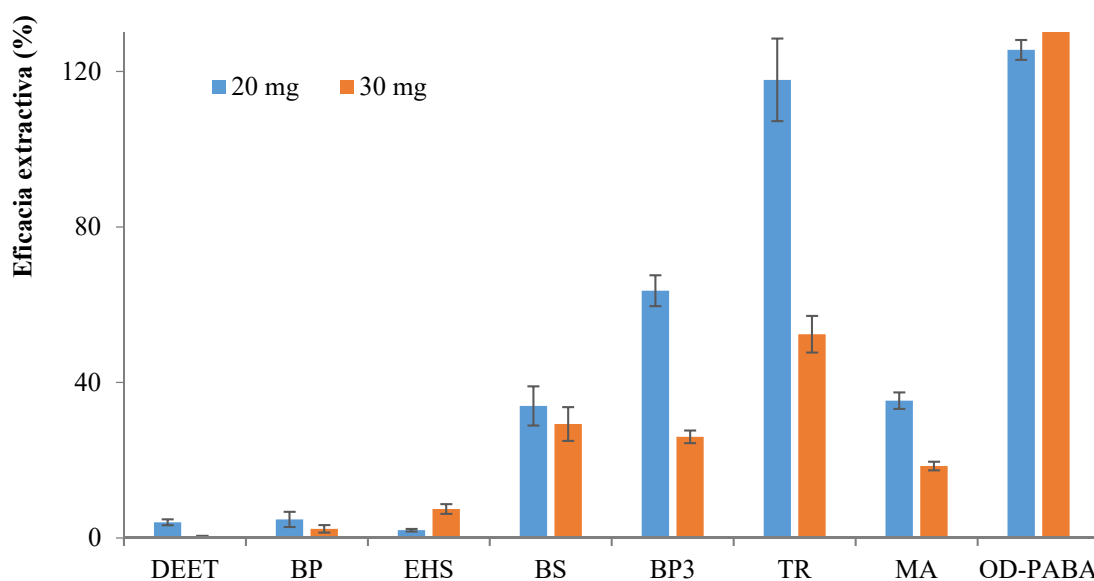


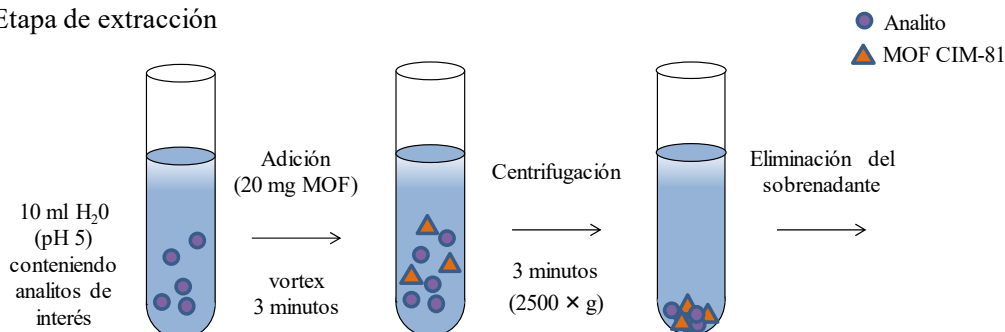
Figura 4.6. Resultados obtenidos de la comparativa de la cantidad de MOF en el método D- μ SPE-GC-MS utilizando el MOF CIM-81 como extractante.

En la Tabla 4.4. se recogen todas las variables y los valores seleccionados del método D- μ SPE-GC-MS desarrollado, y el esquema D- μ SPE-GC-MS optimizado se recoge en la Figura 4.7.

Tabla 4.4. Condiciones seleccionadas del procedimiento D- μ SPE-GC-MS desarrollado haciendo uso del MOF CIM-81.

Variable	Condición óptima
Volumen de muestra (mL)	10
pH	5
<i>Etapa de extracción</i>	
Tiempo de vortex (min)	3
Tiempo de centrifugación (min)	3
<i>Etapa de elución</i>	
Disolvente eluyente	Metanol
Volumen metanol (μ L)	500
Tiempo de vortex (min)	3
<i>Etapa de reconstitución</i>	
Disolvente de reconstitución (ratio)	Ciclohexano:acetato de etilo (9:1)
Volumen de reconstitución (μ L)	100

A) Etapa de extracción



B) Etapa de elución y reconstitución

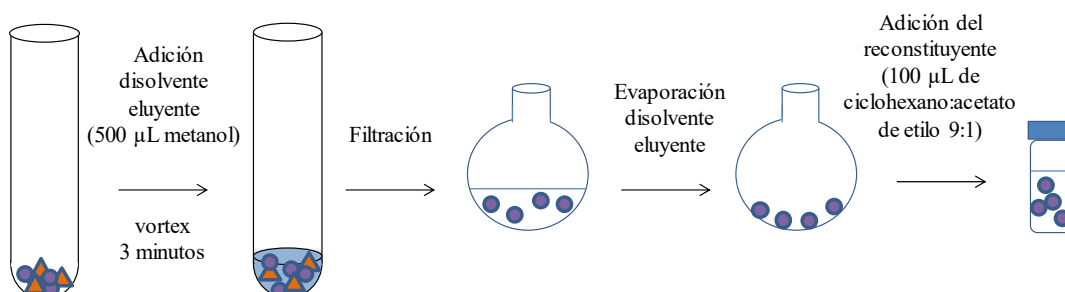


Figura 4.7. Método D- μ SPE-GC-MS utilizando el MOF CIM-81 como extractante con las condiciones óptimas seleccionadas en este estudio.

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

- Se han seleccionado las condiciones óptimas para la extracción de ocho PCPs (seis filtros UV, un desinfectante y un repelente de insecto) en aguas medioambientales, mediante extracción en fase sólida miniaturizada dispersiva (D- μ SPE) combinada con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).
- Un nuevo MOF, el CIM-81, propuesto recientemente, se ha sintetizado adecuadamente en este estudio, avalándose la cristalinidad del material sintetizado.
- Se consiguió una correcta separación por GC de los ocho PCPs estudiados en un tiempo inferior a 14 minutos, lográndose así un método rápido. Asimismo, se validó adecuadamente el método GC-MS, obteniéndose desviaciones estándar $<0.009\%$ en lo que respecta a la reproducibilidad en los tiempos de retención. El método cromatográfico se caracterizó por presentar coeficientes de correlación superiores a 0.995. El método mostró una alta sensibilidad, con LODs entre $0.11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para BP y $0.24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para TR.
- Las variables experimentales que afectan al proceso D- μ SPE (naturaleza del disolvente de elución, volumen del mismo, naturaleza del disolvente de reconstitución, y cantidad de MOF) se estudiaron en profundidad. El procedimiento D- μ SPE óptimo consiste en añadir 20 mg de MOF CIM-81 a 10 mL de agua, tamponada a pH 5. A continuación, se aplica vortex durante 3 minutos y se centrifuga durante 3 minutos ($2500 \times g$). Tras eliminar el sobrenadante, se emplean 500 μL de metanol para la elución de los PCPs del MOF, y se aplica 3 minutos de vortex. Por último, el metanol se evapora y se reconstituyen los PCPs extraídos con 100 μL de la mezcla ciclohexano:acetato de etilo en un ratio 9:1, para finalmente su inyección en el equipo GC-MS.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barceló, D.; López, M. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes; Seguimiento de la política de aguas: CSIC, ES, 2007.
- [2] Pedrouzo, M; Borrull, F; Marcé, R.M; Pocurull, E. Analytical methods for personal-care products in environmental waters. *Trends Anal. Chem.* 2011;30:749–754.
- [3] De la Guardia, M.; Khalaf, K.D.; Carbonell, V.; Morales-Rubio, A. Clean analytical method for the determination of propoxur. *Anal. Chim.* 1995;308:462–468.
- [4] Henrique Fumes, B.; Ribeiro Silva, M.; Nascimento Andrade, F.; Domingues Nazario, C.; Lanças, F.M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *Trends Anal. Chem.* 2015;71:9–25.
- [5] Pacheco-Fernández, I.; Gutiérrez-Serpa, A.; Rocío-Bautista, P.; Pino, V. Molecularly imprinted polymers as promising sorbents in SPME applications. En *SPME Applications in SOLID-PHASE MICROEXTRACTION: Advances in research and Applications*. Nova Science Publishers, 2017, p. 147–168.
- [6] Lucena, R.; Simonet, B.M., Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Potential of nanoparticles in sample preparation. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:620–637.
- [7] Wen, Y.; Chen, L.; Li, J.; Liu, D.; Chen, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. *Trends Anal. Chem.* 2014;59:26–41.
- [8] Rocío-Bautista, P.; González-Hernández, P.; Pino, V.; Pasán, J.; Afonso, A.M. Metal-organic frameworks as novel sorbents in dispersive-based microextraction approaches. *Trends Anal. Chem.* 2017;90:114–134.
- [9] Rocío-Bautista, P.; Pacheco-Fernández, I.; Pasán, J.; Pino, V. Are metal-organic frameworks able to provide a new generation of solid-phase microextraction coatings? – A review. *Anal. Chim. Acta* 2016;939:26–41.

- [10] Yaghi, O.M. Reticular chemistry-construction, properties, and precision reactions of frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* 2016;138:15507–15509.
- [11] Furukawa, H.; Cordova, K.E.; O’Keeffe, M.; Yaghi, O.M. The chemistry and applications of metal-organic framework. *Science* 2013;341:1230444.
- [12] Yang, X.; Xu, Q. Bimetallic metal-organic frameworks for gas storage and separation. *Cryst. Growth Des.* 2017;17:1450–1455.
- [13] Wu, M.-X.; Yang, Y.-W. Metal–organic framework (MOF)-based drug/cargo delivery and cancer therapy. *Adv. Mater.* 2017;29:1606134.
- [14] Zhu, L.; Liu, X.-Q.; Jiang, H.-L.; Sun, L.-B. Metal–organic frameworks for heterogeneous basic catalysis. *Chem. Rev.* 2017;117:8129–8176.
- [15] Kumar, P.; Deep, A.; Kim, K.-H. Metal organic frameworks for sensing applications. *Trends Anal. Chem.* 2015;73:39–53.

GLOSARIO

μ SPE	extracción en fase sólida miniaturizada
AE	acetato de etilo
BP	benzofenona
BP-3	benzofenona-3
BS	bencil salicilato
CHN	ciclohexano
D- μ SPE	extracción en fase sólida miniaturizada dispersiva
DEET	dietiltoluamida
EHS	2-etilhexil salicilato
GC	cromatografía de gases
LOD	límite de detección
LOQ	límite de cuantificación
MA	antranilato de metilo
MOFs	redes metal-orgánicas
MS	espectrometría de masas
OD-PABA	padimato O
PCPs	productos de cuidado personal
SD	desviación estándar
SIM	monitorización de iones simples
SPE	extracción en fase sólida
SPME	microextracción en fase sólida con fibras
TR	triclosan

