

Utilización de hidrogeles sensibles a los cambios de pH en microextracción analítica

Utilization of pH-responsive hydrogels in analytical microextraction

Máster Universitario en Química

Tutoras: Dra. Verónica Pino Estévez y Dra. Ana María Afonso Perera
Departamento de Química (Unidad Departamental de Química Analítica)

Raúl González Martín

Curso 2018/2019

VERÓNICA PINO ESTÉVEZ, PROFESORA TITULAR EN QUÍMICA, Y ANA MARÍA AFONSO PERERA, CATEDRÁTICA DE QUÍMICA ANALÍTICA, DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

INFORMAN: que la presente Memoria titulada “Utilización de hidrogeles sensibles a los cambios de pH en microextracción analítica”, ha sido realizada por el Graduado RAÚL GONZÁLEZ MARTÍN, bajo nuestra dirección, en los laboratorios de la Unidad Departamental de Química Analítica, perteneciente al Departamento de Química de la Universidad de La Laguna, durante el curso 2018-2019, autorizando en esta fecha su presentación.

La Laguna, a 3 de JUNIO de 2019



Fdo.
Dra. Verónica Pino Estévez



Fdo.
Dra. Ana María Afonso Perera

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras de Trabajo Fin de Máster, a la Dra. Verónica Pino Estévez y la Dra. Ana M^a Afonso Perera, por la dedicación y el esfuerzo realizado para sacar este trabajo adelante.

Vero, gracias por confiar en mis capacidades, por demostrar una entrega constante hacia todo lo que haces, por haberme orientado y haber procurado para mí la mejor incorporación posible en el mundo de la investigación. Todo tu esfuerzo y tus ganas son un referente a seguir para mí. Quiero destacar una frase que se me quedará grabada para siempre y que es un ejemplo de superación constante que me has transmitido en uno de los peores momentos que he pasado este año: “la Ciencia se hace a base de tortazos y gente muy injusta. No nos tumbarán”. Al final el trabajo da sus frutos, y la espera merece muchísimo la pena. Gracias por todo, Vero.

Ana, gracias a ti descubrí la belleza de la Química Analítica. Gracias por esa sonrisa constante, por involucrarte al máximo y por preocuparte de que todo salga siempre lo mejor posible. Gracias por haberme transmitido la pasión por la Ciencia y la emoción por un trabajo bien hecho.

También quiero agradecer a Iván, mi mejor amigo, por ser mi gran apoyo y compañía. Tenerte a mi lado durante todo el Máster y contar contigo significa mucho para mí. Gracias por hacer más llevadero este año tan difícil, por soportarme en los peores momentos y por compartir tantas experiencias conmigo. Una amistad como la tuya vale oro.

Quisiera agradecer a los miembros del Grupo de Investigación de “Química Analítica Agroalimentaria y Medioambiental” (GINQAAMA): al Dr. Juan H. Ayala Díaz, por ayudarme siempre que lo he necesitado, y a mis compañeros de laboratorio: Idaira, Provi y Adri, porque compartir tantas horas de trabajo no es fácil y gracias a ellos se ha hecho muy llevadero. Idaira, me has enseñado mucho y siempre estás dispuesta a asesorarme en lo que necesite. Gracias por tantos consejos, por tantas risas, por la emoción cuando las cosas han salido bien. Tu entrega y pasión por lo que haces es admirable. Provi, gracias por enseñarme a ser organizado en el laboratorio y por estar ahí siempre para ayudarme. Gracias por escucharme y preocuparte de que todo me salga bien. Adri, gracias por haber pasado tantas horas conmigo frente al cromatógrafo. Valoro mucho la disciplina que he aprendido gracias a ti.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. David Díaz Díaz todo el asesoramiento que he recibido por su parte a lo largo del trabajo. David, gracias por haber contribuido a abrir un poco más mi mente, por tu gran sabiduría y tus consejos. Gracias por tu entrega constante.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia el apoyo que he recibido a lo largo de este año de Máster. Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana, el pilar fundamental de mi vida, porque sin ellos no hubiera podido superar esta etapa y porque contar con su comprensión y cariño me hace ser muy afortunado. También quiero agradecer a mis abuelos que hayan estado en todo momento pendientes de mí, que se hayan alegrado de mis logros, aunque no entiendan mucho de lo que les hablo, y que tengan plena confianza en mí. Me siento privilegiado de tenerlos a mi lado.

Resumen

Se ha sintetizado y caracterizado el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico para preparar *in situ* un hidrogel sensible a los cambios de pH. El hidrogel generado se ha utilizado por primera vez en el desarrollo y optimización de un método de microextracción analítica para siete contaminantes orgánicos de diferente naturaleza, en combinación con cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente. El método analítico desarrollado se ha validado en términos de sensibilidad, precisión, eficacia extractiva y recuperación relativa. Finalmente, el método se ha aplicado al análisis de diferentes muestras de agua potable.

Abstract

The poly(styrene-*alt*-maleic) anhydride copolymer was synthesized and characterized to prepare *in situ* a pH-responsive hydrogel. The hydrogel was used in the development and optimization of a new analytical microextraction method in combination with high performance liquid chromatography with fluorescence detection to determine seven organic pollutants of different nature. The analytical performance of the entire method was evaluated in terms of sensitivity, precision, extraction efficiency and relative recovery. The developed method was applied to the analysis of different drinking water samples.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Nuevos materiales en técnicas analíticas de preparación de muestras	1
1.1.1. Disolventes utilizados como extractantes	2
1.1.1.1. ILs y sus derivados	2
1.1.1.2. DESs	9
1.1.2. Materiales sólidos utilizados como sorbentes	10
1.1.2.1. Nanomateriales basados en carbono	10
1.1.2.2. MIPs	12
1.1.2.3. MOFs	15
1.1.3. Ejemplos de aplicaciones analíticas de nuevos materiales	18
1.2. Hidrogeles.....	24
1.2.1. Propiedades y aplicaciones	24
1.2.2. Hidrogeles sensibles a la temperatura.....	25
1.2.3. Hidrogeles sensibles a los cambios de pH	29

CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS	31
-------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 3.- EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos, estándares, disoluciones y materiales	35
3.2. Aparatos e instrumentos	39
3.3. <i>Software</i>	39
3.4. Procedimientos	40
3.4.1. Síntesis, purificación y caracterización del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico.....	40

3.4.2. Método HPLC-FD.....	42
3.4.3. Microextracción con hidrogel sensible al cambio de pH (pH-HGME)	43
3.4.4. Limpieza del material.....	43

CAPÍTULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Preparación de un hidrogel sensible a los cambios de pH	47
4.1.1. Síntesis y caracterización del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico	47
4.1.2. Evaluación preliminar de los cambios en disolución del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico debidos a modificaciones del pH	48
4.2. Método cromatográfico	50
4.2.1. Separación cromatográfica.....	50
4.2.2. Validación del método HPLC-FD.....	53
4.3. Hidrogel sensible a los cambios de pH en microextracción analítica	56
4.3.1. Pruebas preliminares de microextracción con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico	56
4.3.2. Optimización del método de microextracción con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico	59
4.4. Validación del método total pH-HGME-HPLC-FD.....	68
4.5. Análisis de muestras de agua.....	77

CAPÍTULO 5.- CONCLUSIONES

GLOSARIO

REFERENCIAS.....

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Nuevos materiales en técnicas analíticas de preparación de muestras

La etapa de preparación de muestras cobra una gran relevancia en el procedimiento analítico, ya que su principal objetivo es minimizar la complejidad de la muestra y eliminar la mayor parte de las interferencias presentes en la matriz de la misma. En algunas ocasiones, además, esta etapa implica una preconcentración para mejorar la sensibilidad del método analítico total. Asimismo, hay que considerar la dificultad que de por sí conlleva la determinación de mezclas de analitos a muy bajas concentraciones en matrices complejas (1).

Entre otras dificultades inherentes a la etapa de preparación de muestras, cabe señalar el alto consumo de tiempo, el elevado coste, los problemas de contaminación y lo tedioso del procedimiento en algún caso. Por ello, las nuevas tendencias en Química Analítica están enfocadas hacia la mejora de los tratamientos de muestras.

Entre el grupo de alternativas propuestas para mejorar los procedimientos convencionales, cabe señalar la introducción de nuevos materiales en los tratamientos de muestras. La búsqueda de nuevos materiales ha sido un campo de investigación muy fructífero en los últimos años y se ha dirigido hacia la síntesis de materiales con mayor capacidad extractiva para analitos de interés que los materiales convencionales, con un mayor rango de aplicabilidad en diferentes técnicas, y que, en conjunto, sean más baratos, fáciles de sintetizar y menos contaminantes (2).

Además, las exigencias en el desarrollo de nuevos materiales con aplicación analítica han venido acompañadas de la implantación de los principios de la Química Analítica Verde (GAC), que se dirigen hacia una disminución en el consumo de reactivos y en la generación de desechos, y hacia una miniaturización de los métodos analíticos (3). En este sentido, el auge producido por la incorporación de nuevos materiales ha tenido lugar paralelamente al desarrollo de técnicas de microextracción como procedimientos de preparación de muestras. Las técnicas de microextracción se caracterizan por el uso de pequeñas cantidades de disolventes o materiales de extracción (del orden de microlitros

o microgramos, respectivamente), lo que minimiza por un lado el consumo de tiempo, y por otro el consumo de reactivos en la metodología analítica con la consecuente disminución de residuos (4).

Cumpliendo con las tendencias en GAC, se han aplicado con éxito numerosos materiales en diferentes técnicas de microextracción. Entre ellos, es posible destacar a los líquidos iónicos (ILs) y sus derivados, los disolventes de punto eutéctico ultra-bajo (DESs), los nanomateriales basados en carbono (fullerenos, nanotubos de carbono de pared simple o múltiple, grafeno...), los polímeros de impronta molecular (MIPs) y las redes metal-orgánicas (MOFs). En la Figura 1.1 y la Figura 1.2 se muestran algunas estructuras representativas de los materiales mencionados.

1.1.1. Disolventes utilizados como extractantes

Los procedimientos convencionales de preparación de muestras se caracterizan por la utilización de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, en su mayoría tóxicos, inflamables y volátiles. Estas características de los disolventes convencionales indudablemente no siguen los principios de la GAC, por lo que se intentan sustituir por otros reactivos menos contaminantes. Los disolventes medioambientalmente sostenibles con mayor aplicación en técnicas de extracción en los últimos años son los ILs y sus derivados, y más recientemente los DESs (5).

1.1.1.1. ILs y sus derivados

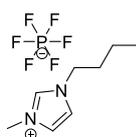
Los ILs son un grupo de disolventes no moleculares con puntos de fusión inferiores a 100 °C, constituidos generalmente por cationes orgánicos voluminosos y asimétricos, y por aniones inorgánicos u orgánicos (6). Estos materiales presentan una presión de vapor despreciable a temperatura ambiente, por lo que no generan compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en condiciones habituales. Por ello, se consideran disolventes sostenibles (7). Existe además una tendencia actual que se dirige a la utilización de

cationes tipo morfolinio o guanidinio, y aniones que incorporan grupos ésteres en su estructura, para asegurar la baja citotoxicidad de estos compuestos (8–10).

ILs y derivados

IL “convencional” C₄MIm-PF₆

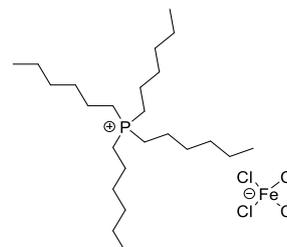
Anión:
hexafluoro fosfato



Catión:
butilmetilimidazolio

MIL P_{6,6,6,6}-FeCl₄

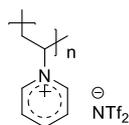
Anión:
tetracloroferrato



Catión:
tetrahexil fosfonio

PIL poly(ViPy)-NTf₂

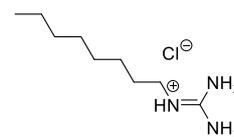
Catión:
poli(vinilpiridinio)



Anión:
bis[(trifluorometil)sulfonil]imida

Surfactante basado en IL C₈Gu-Cl

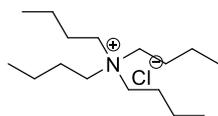
Anión:
cloruro



Catión:
octilguanidinio

DESs

DESs “convencionales”

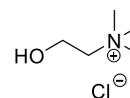


Aceptor de enlaces de hidrógeno:
TBAC (cloruro de tetrabutilamonio)

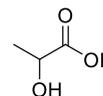


Dador de enlaces de hidrógeno: hexanol

DESs naturales (NADESs)



Aceptor de enlaces de hidrógeno:
cloruro de colina

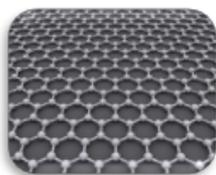


Dador de enlaces de hidrógeno: ácido láctico

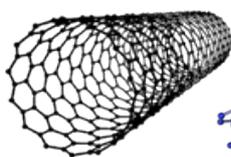
Figura 1.1. Estructuras representativas de ILs, sus derivados y DESs utilizados en técnicas de microextracción analítica en los últimos años.

Nanomateriales basados en carbono

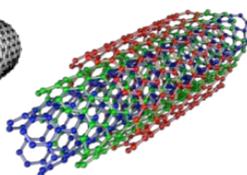
Grafeno



Nanotubos de carbono

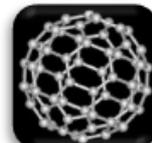


Nanotubo de pared simple (SWCNT)



Nanotubo de pared múltiple (MWCNT)

Fullerenos



C₆₀



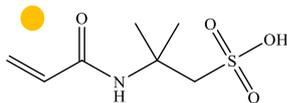
C₂₀

MIPs

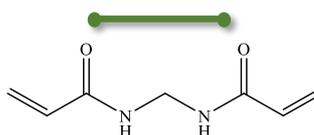
Preparación de MIPs:



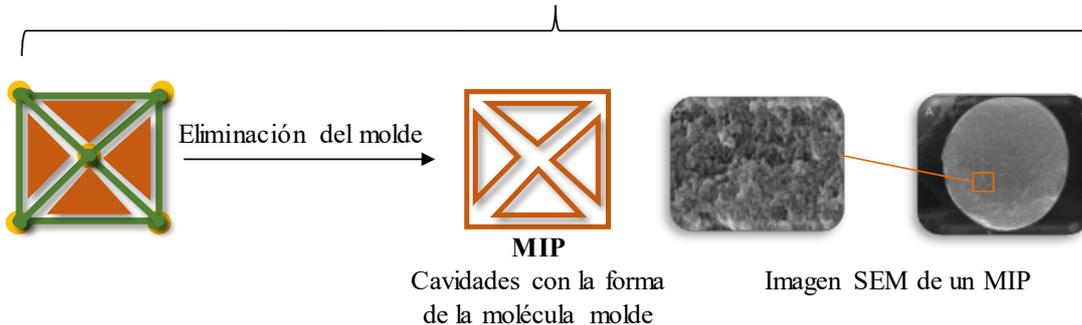
Molécula molde



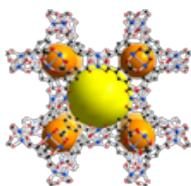
Monómero: ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS)



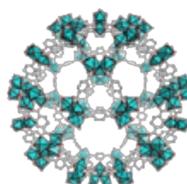
Agente de entrecruzamiento: N,N-metilendiácridamida



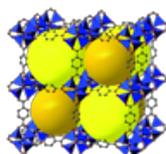
MOFs



HKUST-1
Metal: Cu
Ligando: ácido trimésico



MIL-101(Cr)
Metal: Cr
Ligando: ácido tereftálico



MOF-5
Metal: Zn
Ligando: ácido 1,4-bencenodicarboxílico

Figura 1.2. Estructuras representativas de nanomateriales basados en carbono, MIPs, y MOFs utilizados en técnicas de microextracción analítica en los últimos años.

Aparte de estas ventajas medioambientales, los ILs presentan muchas otras características que justifican su amplia utilización en métodos de microextracción. Entre ellas, se destaca su elevada estabilidad química, térmica y mecánica, su alta conductividad iónica, y su alta capacidad de solvatación para compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica (11). Asimismo, los ILs se consideran disolventes de diseño, ya que la incorporación de pequeñas modificaciones en su estructura genera grandes cambios en las propiedades físico-químicas de los ILs, tales como la solubilidad, la conductividad y la viscosidad. La introducción de grupos funcionales en el catión o la variación de la naturaleza del anión constituyen otro de los aspectos más ampliamente estudiados en los últimos años, con el objeto de diseñar ILs para aplicaciones específicas (12).

La versatilidad sintética de los ILs ha dado lugar asimismo al desarrollo de diferentes derivados de estos compuestos, también de enorme importancia por su aplicabilidad en microextracción analítica en los últimos años. Entre ellos, destacan los polímeros de líquidos iónicos (PILs), los líquidos iónicos magnéticos (MILs) y los surfactantes basados en ILs.

Los PILs son un grupo de polielectrolitos polimerizados a partir de monómeros de ILs. Estos polímeros, al incorporar unidades repetitivas de ILs en sus cadenas poliméricas, conservan algunas de las propiedades más características de los ILs (como por ejemplo su alta capacidad de solvatación), además de presentar aquellas propiedades que son más propias de los polímeros (13). Los PILs se caracterizan por poseer una mayor estabilidad térmica y mecánica que los ILs convencionales, y presentan propiedades superficiales que favorecen su utilización como sorbentes en técnicas de microextracción analítica (14, 15). Los PILs son los únicos derivados de ILs que no se utilizan como disolventes, pero se incluyen en esta sección por su afinidad, tanto estructural como funcional, con los ILs convencionales y con el resto de derivados de ILs.

Los MILs, por su parte, se forman mediante la introducción de metales o complejos de metales paramagnéticos en el catión o el anión de los ILs (16). Además de poseer las propiedades intrínsecas de los ILs, los MILs se caracterizan por exhibir respuesta ante campos magnéticos externos, lo que contribuye enormemente a su amplia utilización como disolventes de extracción en Química Analítica (17, 18), debido a la

facilidad con la que se pueden separar de la fase acuosa con un imán, evitando pasos como la centrifugación o la filtración durante la preparación de muestras.

En cuanto a los surfactantes basados en ILs, están constituidos generalmente por cationes con largas cadenas alquílicas, siendo capaces de formar agregados micelares en agua cuando se encuentran a concentraciones superiores a la respectiva concentración micelar crítica (CMC). Estos derivados de ILs presentan menores CMCs que las de los surfactantes convencionales con estructuras análogas (19), permitiendo por tanto aprovechar las propiedades de las micelas sin necesidad de un alto consumo de materiales. Los surfactantes basados en ILs también se han utilizado con éxito como disolventes de extracción en los últimos años (8, 9, 19).

En la Figura 1.3 se muestran de un modo representativo el porcentaje de publicaciones que hacen uso de técnicas de microextracción analítica en las que se han utilizado ILs y derivados durante los últimos dos años, ya sea como disolventes de extracción o como sorbentes en el caso de los PILs. Las aplicaciones más significativas de los ILs convencionales, surfactantes basados en ILs y MILs han sido en estrategias de microextracción en fase líquida (LPME), acaparando un 80% de las aplicaciones.

En conjunto, la utilización de ILs, MILs y surfactantes basados en ILs como disolventes de extracción en las diferentes variantes de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) ha dado lugar a un mayor número de publicaciones frente a la utilización de estos materiales en otras estrategias de LPME. Por su parte, los PILs han sido utilizados en los últimos dos años principalmente como sorbentes en microextracción en fase sólida (SPME).

En la DLLME, se utilizan volúmenes del orden de microlitros de IL, MIL o surfactante basado en IL como disolvente de extracción. En la modalidad IL-DLLME convencional y MIL-DLLME, el IL y el MIL, respectivamente, son insolubles, con lo que la extracción y preconcentración de los analitos se produce con ayuda de un disolvente dispersor que favorece el contacto entre los analitos y el extractante porque es miscible en ambos. Por otro lado, en la modalidad IL-DLLME *in situ*, en la que el IL o surfactante basado en IL es hidrofílico, la adición de un agente de intercambio o una sal inorgánica

permite insolubilizar el IL con los analitos extraídos y preconcentrados sin necesidad de utilizar disolvente dispersor (20).

En cuanto a los PILs, se han utilizado principalmente como recubrimiento de pocos micrómetros de espesor sobre fibras de SPME, tanto en la modalidad de inmersión directa (DI-SPME) como en espacio en cabeza (HS-SPME), ofreciendo la ventaja de una mayor selectividad en la interacción con los analitos durante la etapa de extracción (13).

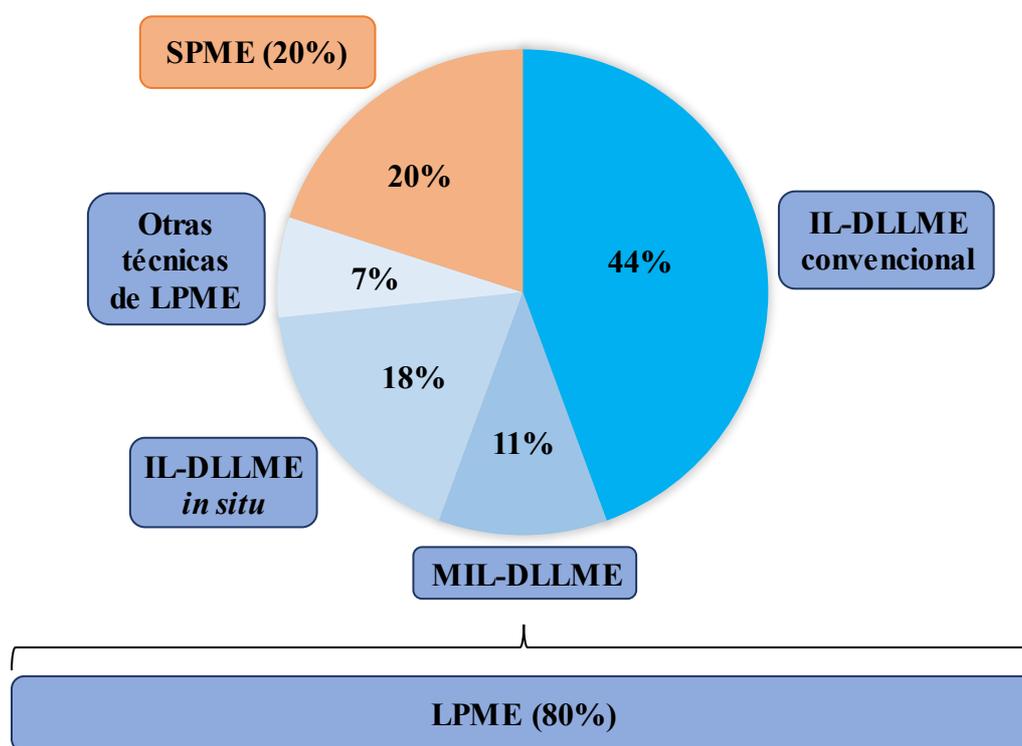


Figura 1.3. Gráfico representativo del número de publicaciones científicas donde se hace uso de las principales técnicas de microextracción analíticas que incorporan ILs y derivados. Los datos corresponden a los años 2018 y 2019 (hasta junio de 2019), y se obtuvieron de la base de datos *Scopus*.

La Figura 1.4 muestra un esquema de las técnicas de microextracción en las que los ILs y sus derivados han tenido mayor aplicación en los últimos años.

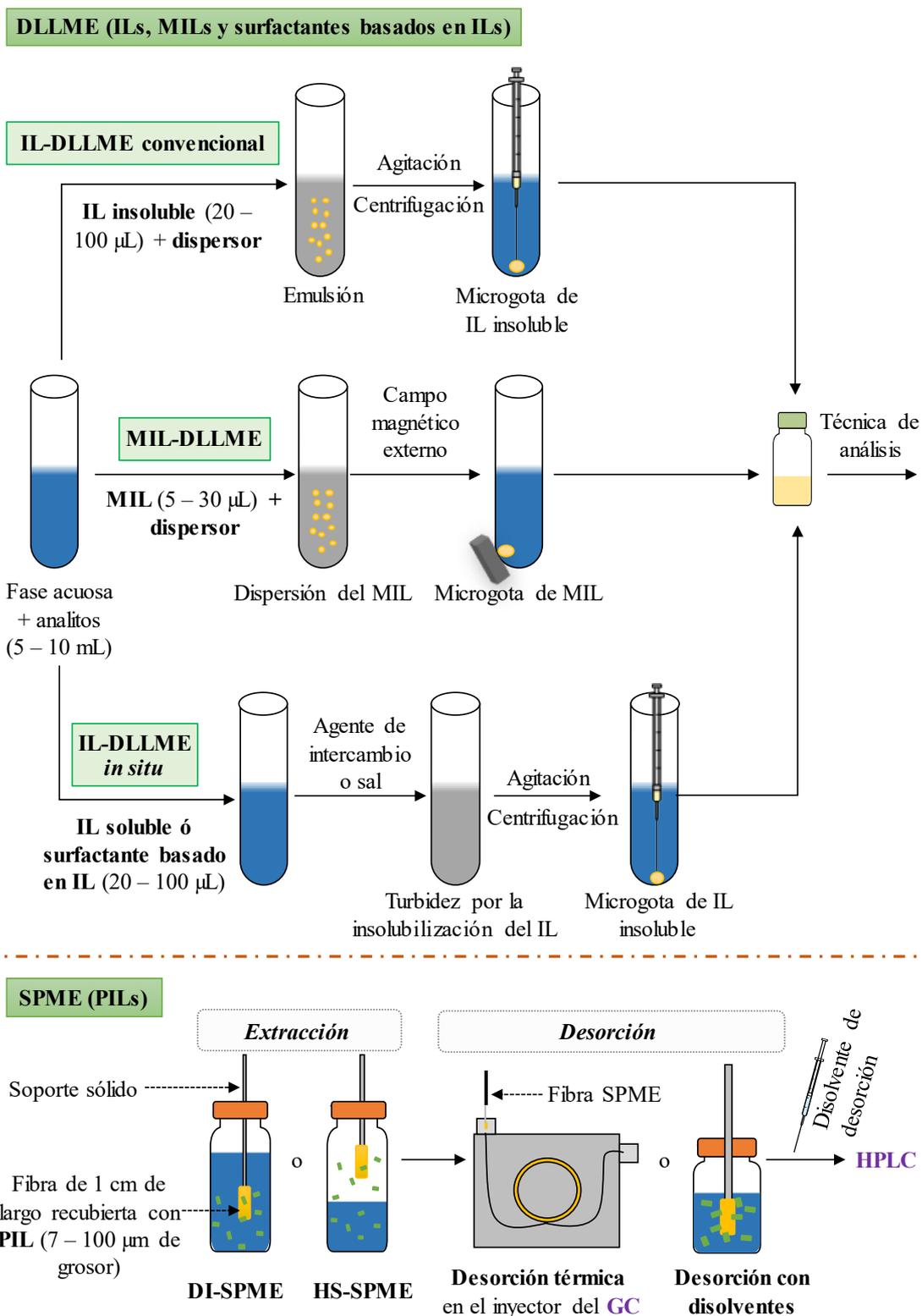


Figura 1.4. Esquemas de las principales técnicas de microextracción analítica en las que se han utilizado ILs y derivados en los últimos años.

1.1.1.2. DESs

Los DESs son un grupo de disolventes constituidos por la mezcla (en diferentes proporciones) de un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) y un dador de enlaces de hidrógeno (HBD). La mezcla resultante presenta un punto de fusión más bajo que la temperatura de fusión de cada uno de los componentes por separado (21).

Los DESs no son inflamables, caracterizándose asimismo por su baja presión de vapor y su estabilidad en medio acuoso. Son fáciles de sintetizar, presentan baja toxicidad, son biodegradables y fácilmente reciclables. Estas propiedades los convierten en prometedoras alternativas frente a otros disolventes convencionales utilizados en extracción (22).

Recientemente se están utilizando productos naturales, como los azúcares y los ácidos orgánicos, para el desarrollo de DESs naturales (NADESs), que resultan ser más biodegradables que los DESs convencionales (23).

Los DESs presentan una toxicidad menor que la de los ILs comúnmente utilizados en microextracción analítica y, además, su síntesis es mucho más simple y rápida, asegurando el cumplimiento de los requisitos de la GAC en relación a la ausencia de disolventes orgánicos en todo el proceso (24).

Mientras que el uso de ILs como disolventes sostenibles está más extendido, las aplicaciones analíticas de los DESs son mucho más recientes, como se muestra en la Figura 1.5, en la que se recoge a modo comparativo el número de publicaciones científicas en los últimos 5 años que utilizan ILs o DESs en técnicas de microextracción analítica. Así, la utilización de DESs ha sido muy limitada, salvo en los últimos 2 años, en los que estos disolventes han presentado un mayor número de aplicaciones (25–27).

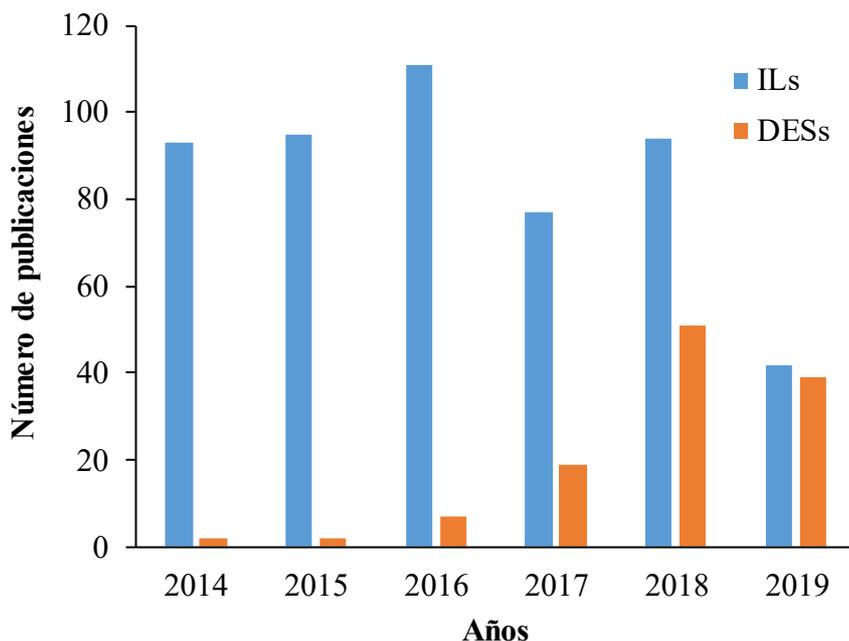


Figura 1.5. Número de publicaciones científicas en las que se han utilizado ILs y DESs en diferentes técnicas de microextracción analítica. Los datos se corresponden con el período 2014-2019 (hasta junio de 2019) y se han obtenido de la base de datos Scopus.

1.1.2. Materiales sólidos utilizados como sorbentes

1.1.2.1. Nanomateriales basados en carbono

Las nuevas técnicas de preparación de muestras, además de incorporar disolventes medioambientalmente sostenibles en las estrategias de microextracción en fase líquida, han introducido nuevos materiales en metodologías de preparación de muestras en fase sólida, beneficiándose de sus propiedades como sorbentes. Entre estos nuevos materiales, los nanomateriales basados en carbono destacan por su estabilidad química, durabilidad, resistencia a la corrosión y elevada área superficial (28). Este tipo de materiales engloban un amplio rango de formas alotrópicas del carbono, entre las que se incluye el nanodiamante, los fullerenos, los nanotubos de carbono (CNTs) y el grafeno. En esta sección se discutirán las principales propiedades y aplicaciones del grafeno y de los CNTs, dado que son los nanomateriales basados en carbono que han presentado una mayor relevancia en técnicas de microextracción analítica en los últimos años (29).

El grafeno es un material derivado del grafito que, desde su aislamiento, se ha utilizado con profusión en la producción de dispositivos electrónicos, debido a su estabilidad térmica, mecánica y electrónica (30). No obstante, su baja reactividad limita las interacciones entre este material y los analitos de interés, por lo que es más habitual el empleo de óxido de grafeno (31, 32). Así, el grafeno y, fundamentalmente, el óxido de grafeno, se han empleado con éxito como sorbentes en técnicas de microextracción analítica, gracias a propiedades como su gran área superficial, su gran resistencia mecánica, la facilidad y el bajo coste de su síntesis, la morfología de *nanosheets* y el sistema de electrones π deslocalizados que presenta en su estructura (33). La morfología de *nanosheets* del grafeno es una característica que no está presente en otras formas alotrópicas del carbono. Los *nanosheets* permiten que ambas caras del grafeno estén simultáneamente disponibles para el proceso de adsorción, posibilitando la extracción de analitos con gran impedimento estérico en sus estructuras moleculares, y que no pueden ser adsorbidos con tanta facilidad por fullerenos o CNTs (30, 34). Asimismo, el sistema de electrones π deslocalizados ofrece posibilidades de extracción de una gran cantidad de compuestos con anillos aromáticos, lo cual resulta ventajoso debido a que la mayor parte de los contaminantes orgánicos presentan anillos aromáticos en su estructura (35, 36).

Por su parte, los CNTs son materiales nanoestructurados unidimensionales formados al enrollar una capa de láminas de grafito en forma cilíndrica con múltiples paredes, dando lugar a los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs); o con una sola pared, generando los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs). Los CNTs se caracterizan por presentar una alta resistencia mecánica, gran estabilidad y elevada conductividad térmica (37). Sus propiedades electrónicas son variables, ya que pueden ser excelentes conductores o semiconductores dependiendo de la conformación estructural de las láminas de grafeno (38). Asimismo, han sido utilizados en Química Analítica debido especialmente a su capacidad para establecer interacciones de diferente naturaleza tanto con compuestos de naturaleza orgánica como inorgánica, así como a la combinación de su pequeño tamaño con una elevada área superficial, que les confiere una gran capacidad de absorción y adsorción (39, 40).

Una ventaja de los CNTs es que se pueden funcionalizar para modificar sus propiedades físico-químicas, dando lugar a una mejora en la selectividad y en la

solubilidad, que es extremadamente baja en muchos disolventes debido a las fuerzas de Van der Waals existentes entre los tubos (39). El proceso de funcionalización incluye con frecuencia un tratamiento oxidante con un ácido fuerte que también reduce las impurezas resultantes del proceso de síntesis, seguido de una reacción orgánica que posibilita la incorporación de grupos funcionales en la superficie del CNT (37). En la Figura 1.6 se observa un ejemplo de funcionalización de CNTs con aminas. El material final dispone de grupos amino en la superficie que favorecen, en este caso, una interacción más selectiva con analitos polares.

En la Figura 1.7 se muestra un gráfico del número de publicaciones científicas en las que se han utilizado los principales nanomateriales basados en carbono (grafeno y CNTs) en técnicas analíticas de preparación de muestras durante los últimos 5 años. Se puede apreciar un mayor uso de los CNTs frente al grafeno, debido a la facilidad con la que se pueden funcionalizar los primeros, lo que proporciona versatilidad y selectividad en las separaciones cuando se utilizan como sorbentes.

1.1.2.2. MIPs

Los MIPs son un grupo particular de polímeros sintéticos caracterizados por presentar propiedades de reconocimiento molecular similares a las exhibidas por biomoléculas naturales como los anticuerpos y las enzimas (41). Estos polímeros reticulados son altamente selectivos, ya que la molécula diana por la cual tienen afinidad específica participa directamente en la síntesis del MIP. Por tanto, los MIPs se consideran materiales de diseño y pueden utilizarse para aplicaciones específicas. Es importante distinguir los MIPs de los polímeros convencionales, que se preparan en ausencia de moléculas molde y, en consecuencia, presentan una estructura tridimensional sin especificidad de reconocimiento (42).

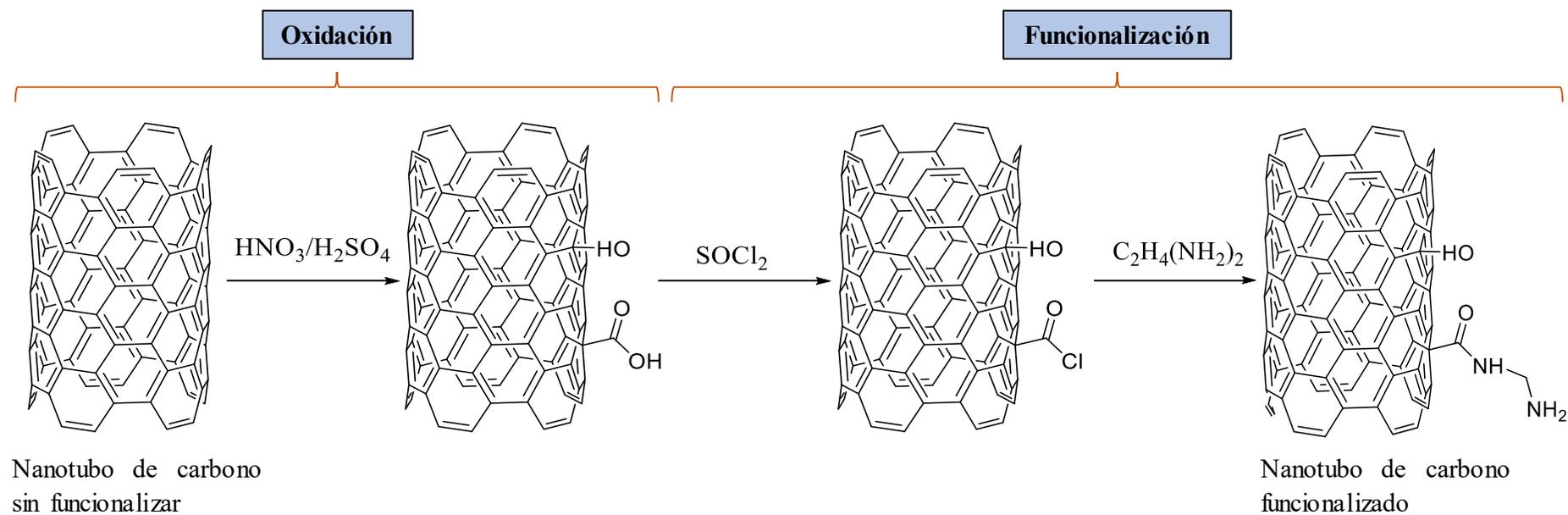


Figura 1.6. Ejemplo de funcionalización de nanotubos de carbono con aminas.

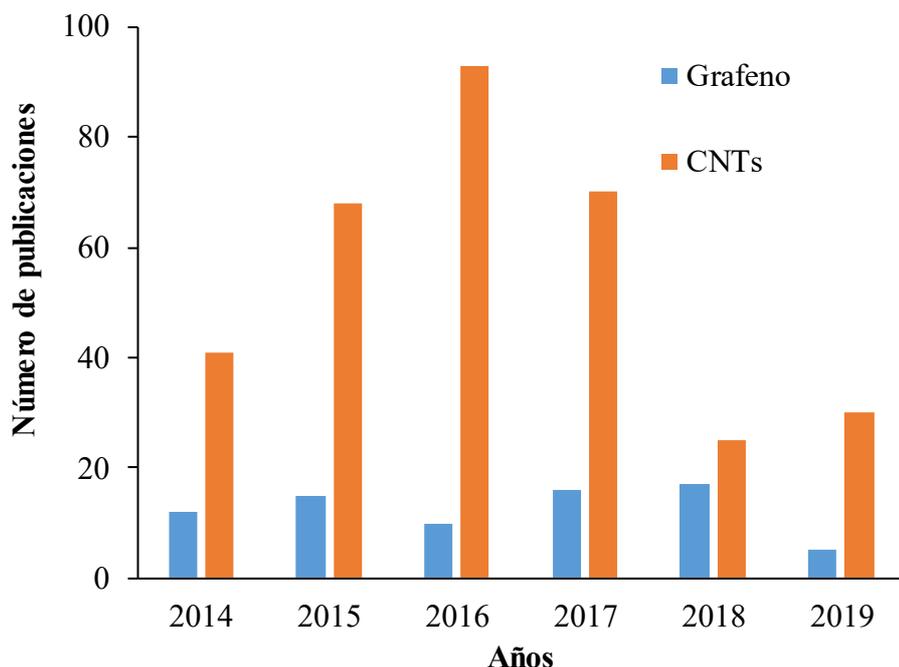


Figura 1.7. Número de publicaciones científicas en las que se han utilizado nanomateriales basados en carbono (grafeno y CNTs) en diferentes técnicas de microextracción analítica. Los datos se corresponden con el período 2014-2019 (hasta junio de 2019) y se han obtenido de la base de datos Scopus.

En la Figura 1.2 se observa el proceso de formación de un MIP. Se parte de un monómero y un agente de entrecruzamiento, como en los polímeros convencionales, con la particularidad de que las cavidades presentes en el polímero final tienen la forma de la molécula molde por la que presentan afinidad. De esta manera, los analitos afines serán reconocidos específicamente por el MIP.

Los MIPs se caracterizan por poseer elevada estabilidad química y mecánica, alta selectividad y una estabilidad térmica moderada. Asimismo, son materiales robustos y se pueden reutilizar fácilmente para diferentes aplicaciones (43). Por ello, en los últimos años se han descrito numerosas aplicaciones de este tipo de polímeros en técnicas de preparación de muestras (44–47).

1.1.2.3. MOFs

Los MOFs son materiales cristalinos formados por la unión de iones o *clusters* metálicos y ligandos orgánicos mediante enlaces de coordinación. Presentan redes tridimensionales ordenadas y se caracterizan por poseer porosidad uniforme, lo que les confiere extraordinarias propiedades para su utilización como sorbentes en técnicas de microextracción analítica (48).

Los MOFs poseen las áreas superficiales más altas conocidas hasta la fecha y bajas densidades. Al igual que los ILs, los MOFs son materiales con una gran versatilidad sintética, debido a la facilidad con la que se puede controlar y modificar la estructura y propiedades del MOF, tales como su porosidad y características cristalinas, a partir de la modificación de las combinaciones metal-ligando y las condiciones de síntesis (49). Tomando en consideración estas propiedades, en los últimos años se han publicado un gran número de artículos que incorporan diferentes MOFs para su utilización en técnicas de microextracción (50–53).

La versatilidad y las excelentes propiedades de los MOFs en microextracción analítica han despertado recientemente el interés en estudiar los mecanismos de interacción del MOF con analitos de diferente naturaleza, con el objetivo de modular y diseñar las estructuras de los MOFs para maximizar su eficacia como sorbentes, incrementando no solo las eficacias de extracción, sino también la selectividad (54, 55). Asimismo, con objeto de desarrollar métodos de microextracción más sostenibles utilizando MOFs, estudios recientes se han centrado en sintetizar MOFs con baja toxicidad, utilizando para ello estrategias sintéticas “verdes”, que eviten en lo posible la presencia de disolventes orgánicos tóxicos y reduzcan el tiempo necesario para llevar a cabo la síntesis (56).

En la Figura 1.8 se observa el aumento en el número de publicaciones que utilizan MOFs como materiales de microextracción durante los últimos 5 años, constatándose que el abanico de aplicaciones está en pleno auge.

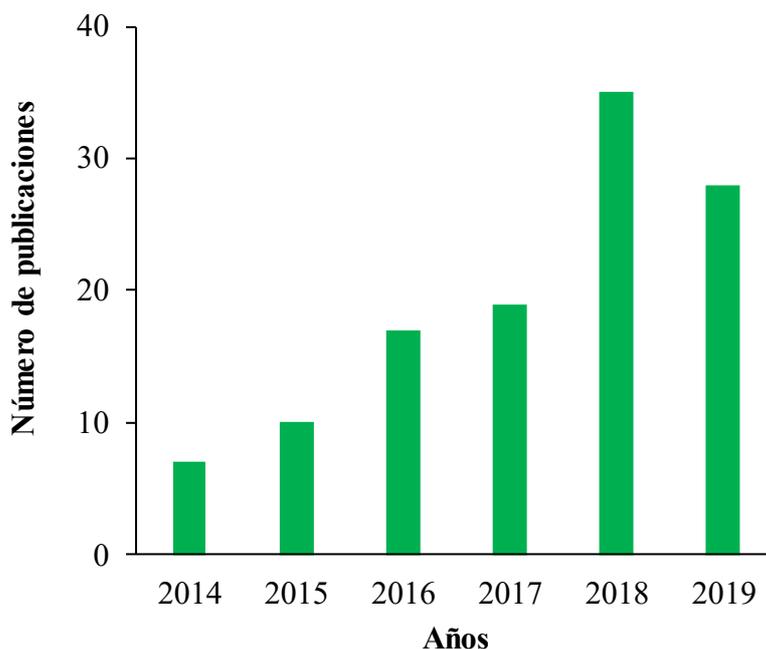


Figura 1.8. Número de publicaciones científicas en las que se han utilizado MOFs en diferentes técnicas de microextracción analítica. Los datos se corresponden con el período 2014-2019 (hasta junio de 2019) y se han obtenido de la base de datos Scopus.

Los materiales utilizados como sorbentes en preparación de muestras (nanomateriales basados en carbono, MIPs, y MOFs) se han utilizado con éxito fundamentalmente en técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida. Los procedimientos generales de dichas técnicas se esquematizan en la Figura 1.9. En todos los casos, la separación de los analitos tiene lugar mediante la retención de los mismos en el material sorbente y su posterior desorción, ya sea con un disolvente o con aplicación de altas temperaturas. En la extracción en fase sólida miniaturizada estática (μ -SPE), se utiliza una cantidad de orden de mg del sorbente, que se encuentra empaquetada en un cartucho a través del cual se hace pasar la muestra con los analitos. Los analitos experimentan retención en el cartucho por interacción con el sorbente, y posteriormente se eluyen con un disolvente adecuado.

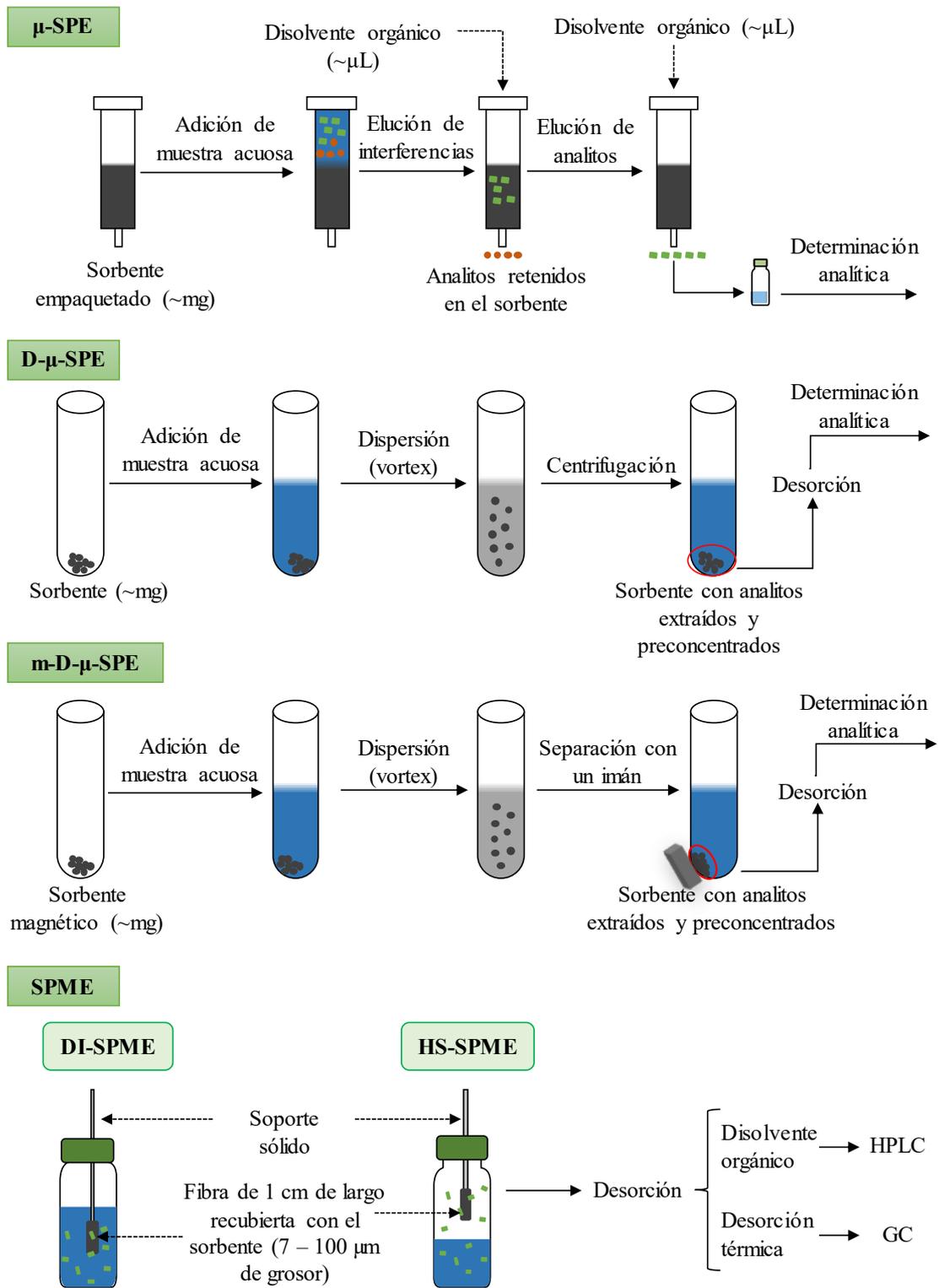


Figura 1.9. Esquemas de las principales técnicas de microextracción analíticas en las que se han utilizado materiales como sorbentes (grafeno, CNTs, MIPs, y MOFs) en los últimos años.

La extracción en fase sólida dispersiva miniaturizada (D- μ -SPE) se basa, por su parte, en dispersar el sorbente en la muestra, lo que posibilita una eficiente y rápida interacción con los analitos, y permite, asimismo, tras centrifugar, separar el sorbente con los analitos extraídos y preconcentrados, que son posteriormente desorbidos para su determinación analítica (57). La versión magnética de esta metodología (m-D- μ -SPE) utiliza material sorbentes magnéticos, de manera que la separación del material con los analitos retenidos se puede realizar fácilmente con un imán, evitando así etapas como la centrifugación o la filtración. En cuanto a la SPME, el sorbente actúa como fase estacionaria recubriendo una fibra y pudiendo extraer los analitos por contacto directo con la muestra (DI-SPME) o en espacio en cabeza, si los analitos son volátiles (HS-SPME).

El éxito de cada material en las diferentes técnicas de microextracción con sorbentes sólidos depende de la estructura, funcionalidad y rango de aplicabilidad del mismo. Por tanto, hay materiales que han presentado mejores resultados en algunas técnicas que en otras y, por ende, ha sido utilizado preferentemente en dichas técnicas. En la Figura 1.10 se recoge a modo comparativo el número de publicaciones en los últimos dos años de cada material sorbente en las diferentes técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida. Así, por ejemplo, todos los materiales tienen el mayor número de aplicaciones en SPME, salvo los CNTs, que han sido utilizados principalmente en D- μ -SPE. La mayor aplicabilidad de grafeno, MIPs y MOFs en SPME se debe a la automatización y simplicidad del proceso, y a la posibilidad de incrementar la selectividad de la extracción diseñando recubrimientos de la fibra con materiales funcionalizados (58).

1.1.3. Ejemplos de aplicaciones analíticas de nuevos materiales

En la Tabla 1.1 se recogen aplicaciones representativas de todos los materiales anteriormente descritos en técnicas analíticas miniaturizadas de preparación de muestras.

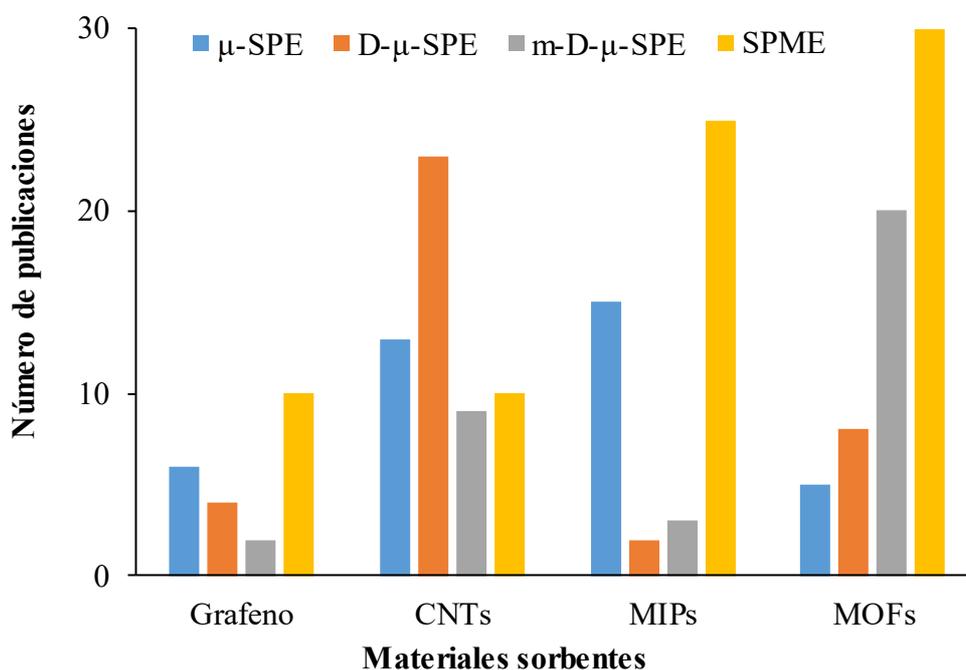


Figura 1.10. Número de publicaciones científicas en las que se han utilizado diferentes materiales como sorbentes en técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida. Los datos corresponden a los años 2018 y 2019 (hasta junio de 2019) y se obtuvieron de la base de datos Scopus.

Como se puede observar, existe una gran diversidad de analitos determinados con estos nuevos materiales en matrices diferentes, utilizando además distintos métodos de extracción acoplados con una gran variedad de técnicas analíticas, principalmente cromatográficas. En la mayor parte de las aplicaciones recogidas en la Tabla 1.1 (9, 15, 17, 25–27, 35, 36, 39, 40, 44–47, 50–53, 59), los límites de detección (LODs) son del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. La sensibilidad alcanzada es tan elevada porque generalmente los materiales utilizados en las técnicas de microextracción posibilitan alcanzar una alta preconcentración, lo que aumenta la eficacia del procedimiento de preparación de muestras al mismo tiempo que cumple con los requisitos de la GAC si se tienen en cuenta las pequeñas cantidades utilizadas de material en todos los casos (del orden de mg o μL), minimizando asimismo la cantidad de muestra requerida, en la mayoría de los casos nunca superior a los 20 mL.

Tabla 1.1. Ejemplos representativos de aplicaciones de nuevos materiales en técnicas analíticas de preparación de muestras.

Material ¹	Aplicación del material	Cantidad de material / Tamaño de dispositivo	Analitos (nº) ²	Matriz	Método de extracción ³	Técnica analítica	LOD (ng·L ⁻¹)	Ref.
ILs y derivados								
IL	disolvente de extracción	90 mg / -	cortisona y cortisol	saliva humana	DLLME	HPLC-UV	110 – 160	(59)
C ₄ MIm-PF ₆								
PILs	recubrimiento de columna	- / recubrimiento de 1.7 µm en una columna de 10 cm	endocannabinoides (2)	plasma	SPME	UHPLC-MS/MS	20 – 30	(15)
[VC ₁₆ Im][Br]								
[(VIm) ₂ C ₁₀] ₂ [Br]	disolvente de extracción	20-30 mg / -	filtros ultravioleta (4), PAHs (2), alquilfenoles (2), plastificantes (1), conservantes (1)	agua	DLLME	HPLC-DAD	130 – 5200	(17)
MILs								
[Ni(C ₄ Im) ₄] ₂ [Cl]								
[Ni(BeIm) ₄] ₂ [Cl]								
Surfactante basado en IL	disolvente de extracción	20 µL / -	OH-PAHs (4)	orina	DLLME	HPLC-FD	0.5 – 2	(9)
C ₁₀ Gu-Cl								

Tabla 1.1. (continuación)

Material ¹	Aplicación del material	Cantidad de material / Tamaño de dispositivo	Analitos (n°) ²	Matriz	Método de extracción ³	Técnica analítica	LOD (ng·L ⁻¹)	Ref.
DESS								
DES (TBAC + hexanol)	disolvente de extracción	200 µL / -	aflatoxinas (4)	cultivos	MSPD	HPLC-FD	30 – 100 ng·kg ⁻¹	(25)
DES (ácido dicloroacético, butanol y mentol)	disolvente de extracción	85 µL / -	plaguicidas (10)	tomate	QuEChERS y DLLME	GC-FID	420 – 740 ng·kg ⁻¹	(26)
DES (TBAB + ácido glicólico)	disolvente de extracción	1 g / -	lisozima	clara de huevo	DESS-ABSs	UV-Vis	3530 µg·L ⁻¹	(27)
Nanomateriales basados en carbono								
MCNT	sorbente	40 mg / -	sulfonamidas (13)	leche	m-D-µ-SPE	HPLC-MS	2 – 10	(39)
MWCNT	sorbente	20 mg / -	atrazina	agua	µ-SPE	HPLC-UV	660	(40)
G-Fe ₃ O ₄	sorbente	20 mg / -	plaguicidas (7)	agua	D-µ-SBSE	HPLC-DAD	500 – 9500	(35)

Tabla 1.1. (continuación)

Material ¹	Aplicación del material	Cantidad de material / Tamaño de dispositivo	Analitos (n°) ²	Matriz	Método de extracción ³	Técnica analítica	LOD (ng·L ⁻¹)	Ref.
GEM	adición al monolito adsorbente que recubre la fibra	- / monolito con 5 mg de grafeno recubriendo una fibra de 2 cm	herbicidas de ácido fenoxiacético	agua	DI-SPME	HPLC-DAD	93 – 120	(36)
MIPs								
MIPs Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @MIPs	sorbente	100 mg / -	diuron	arroz y semillas de grano	separación magnética con MIPs	HPLC-DAD	12000	(44)
MIP	sorbente	90 mg / -	nitrosaminas (5)	agua y bebidas	μ-SPE	HPLC-MS/MS	0.2 – 0.7	(45)
MIP	recubrimiento de la fibra	- / fibra de 4 cm	ácido valproico	suero, jarabe y pastilla	HS-SPME	GC-FID	10	(46)
MIP	sorbente	200 mg / -	bisfenol A	té	μ-SPE	HPLC-MS	72	(47)

Tabla 1.1. (continuación)

Material ¹	Aplicación del material	Cantidad de material / Tamaño de dispositivo	Analitos (nº) ²	Matriz	Método de extracción ³	Técnica analítica	LOD (ng·L ⁻¹)	Ref.
MOFs								
MOF MAF-66(Zn)	recubrimiento de la fibra	- / recubrimiento de 15 µm en una fibra de 3 cm	PAHs (7)	agua, papas y cerdo	HS-SPME	GC-FID	0.1 – 7.5	(50)
MOF UiO-66(Zr)	sorbente	10 mg / -	hormonas (4)	agua	µ-SPE	HPLC-MS/MS	2 – 10	(51)
MOF MIL-101(Cr)	sorbente	5 mg / -	estrógenos (4)	agua	µ-SPE	UHPLC-MS/MS	0.95 – 23	(52)
MOF CIM-81(Zn)	sorbente	10 mg / -	filtros ultravioleta (4), desinfectante (1), conservantes (4)	agua residual	D-µ-SPE	UHPLC-UV	500 – 1500	(53)

¹ Abreviaturas: ILs para líquidos iónicos, PILs para polímeros de líquidos iónicos, MILs para líquidos iónicos magnéticos, DESs para disolventes de punto eutéctico ultra-bajo, TBAC para cloruro de tetrabutilamonio, TBAB para bromuro de tetrabutilamonio, MCNT para nanotubos magnéticos, MWCNT para nanotubos de carbono de pared múltiple, G-Fe₃O₄ para grafeno modificado con nanopartículas magnéticas, GEM para grafeno en un monolito adsorbente, MIPs para polímeros de impronta molecular, MOFs para redes metal-orgánicas.

² Abreviaturas: PAHs para hidrocarburos aromáticos policíclicos, OH-PAHs para hidrocarburos aromáticos policíclicos monohidroxilados.

³ Abreviaturas: DLLME para microextracción líquido-líquido dispersiva, SPME para microextracción en fase sólida, MSPD para dispersión de la matriz en fase sólida, QuEChERS para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, ABSs para sistemas bifásicos acuosos, m-D-µ-SPE para extracción en fase sólida dispersiva magnética miniaturizada, µ-SPE para extracción en fase sólida miniaturizada, D-µ-SBSE para extracción en fase sólida dispersiva miniaturizada sobre barrita agitadora, DI para inmersión directa, HS para espacio en cabeza, D-µ-SPE para extracción en fase sólida dispersiva miniaturizada.

A pesar de que los materiales descritos se utilizan con éxito en microextracción, la búsqueda y desarrollo de nuevos materiales, o incluso modificaciones de los ya existentes, sigue siendo una línea de investigación fructífera en Química Analítica. En este sentido, se sigue ahondando en la búsqueda de materiales que presenten una preparación sintética simple, así como una menor toxicidad y una mayor versatilidad para diferentes técnicas, que sean fácilmente funcionalizables para incrementar la selectividad de la interacción con analitos diana, y que proporcionen una mayor eficacia extractiva con respecto a tales analitos.

1.2. Hidrogeles

1.2.1. Propiedades y aplicaciones

Los hidrogeles son redes tridimensionales formadas por polímeros hidrofílicos capaces de absorber grandes cantidades de agua. Estos materiales presentan una serie de propiedades únicas, como la biodegradabilidad, la biocompatibilidad, una destacable capacidad de hinchamiento (*swelling*) y una elevada resistencia mecánica (60).

Los hidrogeles son materiales sensibles a los estímulos, debido a que son capaces de experimentar un gran cambio de volumen en respuesta a pequeñas modificaciones en parámetros ambientales como la temperatura, el pH o la fuerza iónica (61). De esta manera, los hidrogeles más comunes pueden ser sensibles a los cambios de temperatura, sensibles a los cambios de pH o incluso exhibir una doble respuesta a pH y temperatura, en función de las condiciones del medio y la aplicación para la que son diseñados.

Las propiedades de los hidrogeles los han convertido en materiales muy versátiles, con una amplia utilización en una gran variedad de aplicaciones. La biocompatibilidad, su carácter hidrofílico y la capacidad de controlar su volumen e hinchamiento con relativa facilidad han dado lugar a su utilización con éxito en la liberación controlada de fármacos (62, 63). Asimismo, su elevada resistencia mecánica ha propiciado la utilización en biomedicina para regeneración de tejidos (64, 65).

Los hidrogeles también se han diseñado como catalizadores orgánicos medioambientalmente sostenibles, debido a su destacable biodegradabilidad (66). La búsqueda de materiales más respetuosos con el medioambiente ha llevado a explorar las aplicaciones de hidrogeles creados a partir de biopolímeros, denominados (bio)hidrogeles, que pueden estar constituidos por polisacáridos (chitosán, alginato, dextrano y agarosa, por ejemplo), proteínas (gelatina) y ácidos nucleicos (ADN). Estos hidrogeles están formados exclusivamente por estructuras naturales, con lo que son una alternativa verde, sostenible y renovable a otros materiales convencionales (67).

Al igual que los hidrogeles presentan propiedades que han favorecido su aplicación en liberación controlada de fármacos, en la que el cambio abrupto de volumen que son capaces de experimentar permite el encapsulamiento de fármacos y posterior liberación en el organismo, parece lógico que estos materiales también puedan ser utilizados con fines extractivos. Las moléculas de interés (analitos) presentes en un medio acuoso pueden interactuar con el hidrogel y, en respuesta a cambios en pH o temperatura, el material modifica su volumen, “encapsulando” así en su estructura a los analitos para su posterior determinación analítica. Sin embargo, prácticamente no existen estudios que impliquen hidrogeles en estrategias analíticas de extracción, con lo que no se han explorado de manera exhaustiva las posibilidades de este tipo de materiales en preparación de muestras, al contrario que los materiales descritos en la sección 1.1.

En la Tabla 1.2 se recogen cuatro ejemplos representativos de aplicaciones de hidrogeles en extracción analítica (68–71), constituyendo hasta la fecha las únicas aplicaciones analíticas en microextracción.

1.2.2. Hidrogeles sensibles a la temperatura

Los hidrogeles sensibles a la temperatura están formados por polímeros que sufren una modificación en sus propiedades físicas cuando se incrementa la temperatura. Se caracterizan por presentar lo que se conoce como temperatura crítica de disolución (CST), a la cual la disolución del polímero pasa de ser homogénea a formar dos fases (72).

Tabla 1.2. Aplicaciones de hidrogeles en extracción analítica.

Tipo de hidrogel	Polímero ¹	Cantidad de hidrogel	Analitos (n°)	Matriz	Método de extracción ²	Técnica analítica	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
sensible a los cambios de pH	alcohol polivinílico-pectina	n.r.	hormonas esteroideas (6)	agua	SPE	GC-MS	150 – 300	(68)
(bio)hidrogel	chitosán	25 mg	cadmio	plantas	MCH-D-m- μ -SPE	FAAS	0.20	(69)
respuesta doble pH/temperatura	PCMS-PDMAEMA	30 mg	fluoroquinolonas (5)	agua, carne y leche	D- μ -SPE	HPLC-MS	0.005 – 0.007	(70)
sensible a la temperatura	poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)- β -ciclodextrina	n.r.	fenoles (4)	agua de río	DLLME	GC-MS	0.01 – 1.0	(71)

n.r.: no reportado

¹ Abreviaturas: PCMS-PDMAEMA para poli(4-clorometilostireno)- poli(dimetilaminoetilmetacrilato).

² Abreviaturas: SPE para extracción en fase sólida, MCH- D-m- μ -SPE para extracción en fase sólida dispersiva miniaturizada con hidrogel magnético de chitosán, D- μ -SPE para extracción en fase sólida dispersiva miniaturizada, DLLME para microextracción líquido-líquido dispersiva.

Los polímeros sensibles a la temperatura con valores bajos de temperatura crítica de disolución (LCST), se vuelven insolubles con el calentamiento, mientras que los polímeros con una temperatura crítica de disolución alta (UCST), se vuelven solubles al aumentar la temperatura (73).

La facilidad con la que se puede controlar la temperatura del medio y, consecuentemente, la solubilidad del polímero, posibilita la generación de hidrogeles *in situ* a temperaturas determinadas. El proceso de gelificación asistido por la temperatura es reversible, de manera que el gel puede insolubilizarse y posteriormente volver a formar una disolución homogénea cuando el calentamiento utilizado como estímulo se detiene. Los polímeros sensibles a la temperatura, por tanto, mantienen en su estructura un balance hidrofóbico-hidrofílico, por lo que un pequeño incremento alrededor de su valor de LCST produce un colapso en las cadenas poliméricas que modifica las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre dichas cadenas y el medio acuoso (65). En la Figura 1.11 se representa esquemáticamente la formación de un hidrogel sensible a la temperatura.

El mecanismo de gelificación asistido por temperatura puede ser controlado para la extracción de compuestos presentes en el medio acuoso, como se observa en el ejemplo de la Figura 1.11 para un polímero con LCST. Si las cadenas poliméricas son capaces de interaccionar de manera efectiva con los analitos cuando forman una disolución homogénea con el agua, un cambio de temperatura en torno al valor de LCST puede insolubilizar el hidrogel conteniendo los analitos extraídos. No obstante, a pesar de su gran potencial, la utilización de hidrogeles sensibles a la temperatura en microextracción analítica no está muy extendida, y se han descrito pocas aplicaciones, ya sea con polímeros que exclusivamente exhiben respuesta a la temperatura (71) o con polímeros con doble respuesta a pH y a temperatura (70).

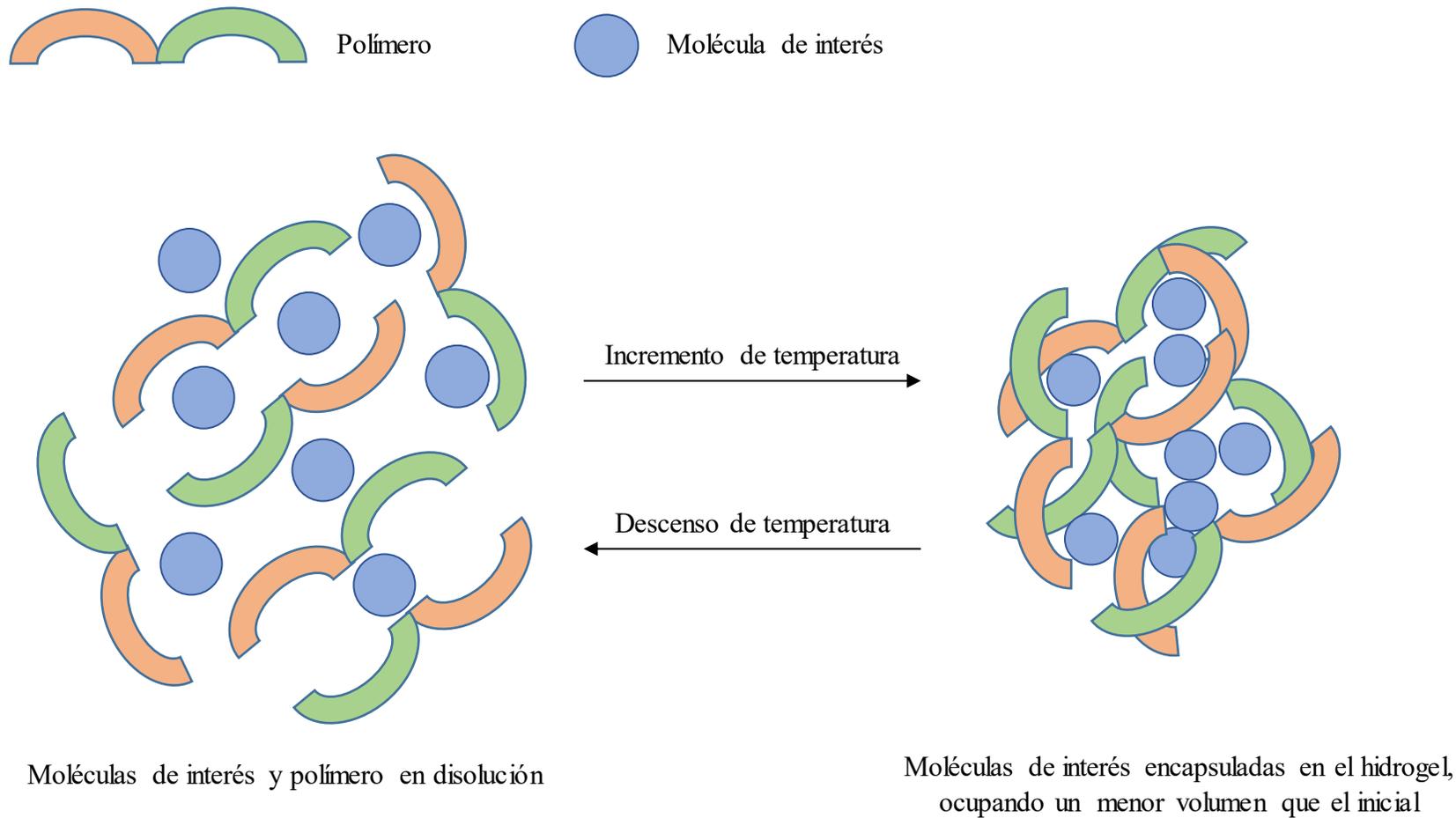


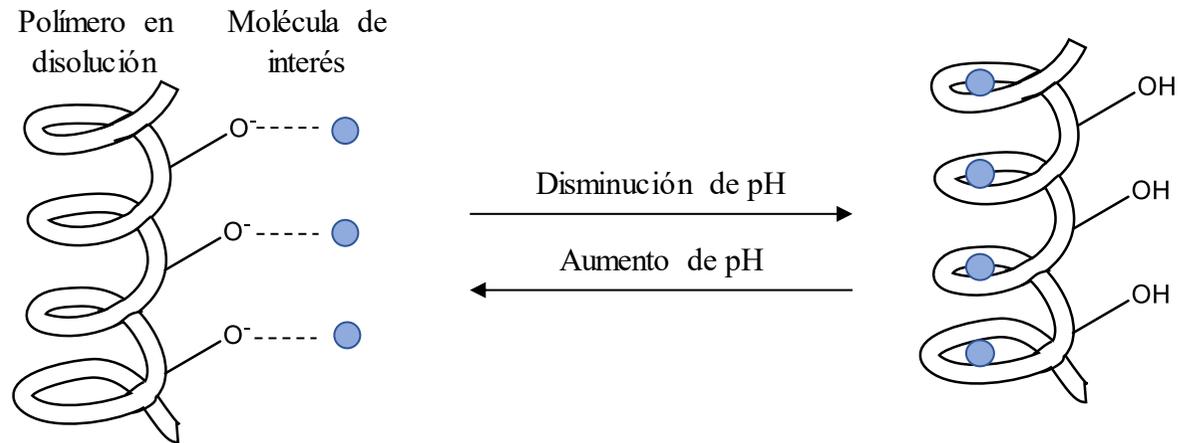
Figura 1.11. Esquema de formación de un hidrogel sensible a la temperatura con LCST.

1.2.3. Hidrogeles sensibles a los cambios de pH

Los hidrogeles sensibles a los cambios de pH están constituidos por polímeros con grupos funcionales ácidos o básicos en su estructura. El hidrogel se puede formar *in situ* en el medio acuoso cuando dichos grupos funcionales aceptan o ceden protones en respuesta a un cambio en el pH de la disolución (74).

Los polímeros sensibles a los cambios de pH pueden solubilizarse en medio acuoso e insolubilizarse de manera reversible, al igual que aquellos sensibles a la temperatura. En este caso, un intercambio de protones a un pH determinado, en función de la estructura polimérica y los grupos funcionales presentes en ella, es capaz de generar una fase rica en hidrogel conteniendo las moléculas de interés. En la Figura 1.12 se muestra un esquema de la formación de un hidrogel sensible a los cambios de pH y de las interacciones que posibilitan la separación de las moléculas de interés haciendo uso de este material.

Las aplicaciones analíticas de los hidrogeles sensibles a los cambios de pH son muy escasas, particularmente si se compara con la amplia utilización de estos materiales en aplicaciones biomédicas (62, 63, 75). No obstante, el potencial de este tipo de hidrogeles en estrategias de extracción y preconcentración es enorme, dada la facilidad con la que se puede controlar el pH del medio para modular la interacción entre el hidrogel y los analitos. La estructura del polímero que genere el posterior hidrogel debe ser adecuada para que se produzca la respuesta deseada al modificar el pH, con lo que es necesario que existan grupos ácidos o básicos en la misma. De esta manera, se puede favorecer el reparto de los analitos entre el hidrogel y la fase acuosa por simple protonación o desprotonación.



Hidrogel interactuando con las moléculas de interés a un pH determinado

Moléculas de interés “encapsuladas” en el polímero, que se ha insolubilizado por cambio de pH formando una fase rica en hidrogel

Figura 1.12. Esquema del mecanismo de interacción de un hidrogel sensible a los cambios de pH con moléculas de interés.

CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS

Existen muy pocas aplicaciones de hidrogeles sensibles a los cambios de pH en microextracción analítica, mientras que, para otros materiales como ILs, DESs, nanomateriales basados en carbono, MIPs y MOFs, no solo se han utilizado con éxito en técnicas de preparación de muestras, sino que también se han realizado modificaciones estructurales de los mismos para maximizar su eficiencia en los procedimientos analíticos. Es de interés, por tanto, integrar los hidrogeles sensibles a los cambios de pH en aplicaciones de microextracción con el objetivo de utilizar sus excelentes propiedades para la extracción y preconcentración analítica.

Teniendo en cuenta las consideraciones con respecto a la necesaria presencia de grupos ácidos y básicos en la estructura de los polímeros constituyentes de los hidrogeles sensibles a los cambios de pH, el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico es el seleccionado en este estudio ya que resulta sin duda un prometedor material (76), debido a los cambios que puede sufrir como consecuencia de la adición de HCl o NaOH. Las aplicaciones de dicho copolímero en Química Analítica se han limitado a su empleo como medio de extracción para un solo compuesto, ya sea una molécula orgánica (concretamente verde de malaquita) (77) o un metal pesado formando parte de un complejo (concretamente cobre con 2-carboxi-2-hidroxi-5-sulfoformazilbenceno) (76), y en combinación con técnicas espectroscópicas. En este sentido, las metodologías descritas adolecen de falta de sensibilidad y por tanto no se han aprovechado las posibilidades de preconcentración que estos materiales pueden ofrecer si se integran convenientemente en estrategias de microextracción en combinación con cromatografía. Así, es importante destacar que el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico no se ha utilizado hasta la fecha en el desarrollo de metodologías analíticas de microextracción, siendo por tanto el material seleccionado en este estudio para poner a punto un método de microextracción y preconcentración analítica, conjuntamente con cromatografía líquida de alta resolución.

Por todo ello, el objetivo general del presente trabajo de investigación desarrollado como Trabajo Fin de Máster pretende la puesta a punto de una metodología de microextracción y preconcentración analítica, en combinación con HPLC-FD, haciendo

uso de un hidrogel sensible al cambio de pH, para la determinación de un conjunto de analitos de naturaleza orgánica.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Síntesis y caracterización del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico, como punto de partida para la formación de un hidrogel.
- Evaluación del comportamiento del copolímero sintetizado en disolución acuosa a diferentes valores de pH, como ensayo confirmatorio de su utilidad para la generación *in situ* de un hidrogel sensible a los cambios de pH.
- Optimización de la separación cromatográfica de 7 contaminantes orgánicos de diferente naturaleza (3 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), 3 PAHs monohidroxilados y 4-nonilfenol) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorescente (FD); así como conveniente validación del método HPLC-FD.
- Optimización de un método de microextracción haciendo uso del hidrogel sensible a los cambios de pH generado a partir del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico (pH-HGME).
- Desarrollo y validación del método analítico total pH-HGME-HPLC-FD en términos de sensibilidad, precisión, eficacia extractiva y recuperación relativa.
- Aplicación del método pH-HGME-HPLC-FD al análisis de muestras de agua.

Asimismo, con la realización de este Trabajo Fin de Máster se pretende alcanzar los siguientes objetivos asociados a la titulación:

- Realizar con eficacia búsquedas bibliográficas exhaustivas en bases de datos científicas para conocer los antecedentes y el fundamento teórico tanto de los materiales en estudio (hidrogeles) como de la técnica analítica de preparación de muestra (microextracción).

- Desempeñar de un modo autónomo una labor experimental de investigación.
- Comunicar con éxito, tanto de forma oral como de forma escrita, los resultados obtenidos en esta investigación científica.

CAPÍTULO 3.- EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos, estándares, disoluciones y materiales

Los reactivos utilizados para la síntesis del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico fueron el estireno (>99.9%) y el anhídrido maleico (99%), ambos suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Asimismo, se utilizó *N,N*-dimetilformamida (DMF, $\geq 99.5\%$), proporcionada por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), como disolvente de síntesis, y azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador radicalario proporcionado por Sigma-Aldrich. Para la purificación del copolímero se hizo uso de dietiléter ($\geq 99.7\%$), suministrado por Sigma-Aldrich. El disolvente en el que se realizó la caracterización del copolímero por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$), fue el dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6), suministrado por Sigma-Aldrich.

Entre los analitos estudiados se encuentran tres hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs): fluoreno (Flu, 98%), fluoranteno (Ft, 98%) y benzo[a]antraceno (BaA, 99%), todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich. Asimismo, se estudiaron tres PAHs monohidroxilados (OH-PAHs): 2-hidroxinaftaleno (2OHnap, 99.9%), 2-hidroxifluoreno (2OHflu, 98%) y 2-hidroxifenantreno (2OHphe, estándar con una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en acetonitrilo); y un alquilfenol, el 4-nonilfenol (NnP, 99%). Tanto los OH-PAHs como el NnP fueron proporcionados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). La Tabla 3.1 contiene las estructuras químicas y algunas de las propiedades físico-químicas más significativas de los analitos estudiados.

Se prepararon disoluciones individuales para cada uno de aquellos analitos cuyos estándares originales estaban en forma de sólidos, utilizando acetonitrilo (ACN) HiPerSolv Chromanorm grado LC, proporcionado por VWR (Llinars del Vallés, España), a las siguientes concentraciones: 2OHnap a $560 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2OHflu a $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Flu a $4100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Ft a $2600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, BaA a $2160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y NnP a $1003 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir de los estándares preparados y del patrón comercial de 2OHphe ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), se realizaron cuatro disoluciones intermedias en ACN conteniendo todos los analitos, de $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 1000

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que fueron utilizadas para la preparación de estándares de trabajo tanto durante la validación del método cromatográfico, como en la optimización del método microextractivo y en la validación del método analítico total. Todas las disoluciones se conservaron refrigeradas a $4\ ^\circ\text{C}$ en nevera y protegidas de la luz.

Para la optimización del método microextractivo se utilizó ácido clorhídrico (37%, v/v), proporcionado por Honeywell FlukaTM (Seetze, Alemania), e hidróxido sódico ($\geq 99.5\%$) suministrado por Sigma-Aldrich. Se prepararon disoluciones de los mismos a concentraciones de $2.00\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3.00\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para el NaOH, y de $2.50\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $3.75\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $5.00\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6.25\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $7.50\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para el HCl.

En la síntesis del copolímero se utilizaron viales transparentes de vidrio de 20 mL suministrados por Varian (Palo Alto, CA, Estados Unidos), conjuntamente con tapones y *septa* de politetrafluoroetileno (PTFE), proporcionados por Supelco (Bellefonte, PA, Estados Unidos). Además, durante el proceso de polimerización se emplearon barritas agitadoras de $15 \times 4.5\ \text{mm}$ suministradas por Sigma-Aldrich.

Las extracciones se llevaron a cabo en tubos de centrifuga Pyrex[®] (Staffordshire, Reino Unido) de 15 mL ($9.5 \times 2\ \text{cm}$). Para las medidas de volumen se utilizaron micropipetas EppendorfTM (Hamburgo, Alemania), con rangos de 0.50 a $10.00\ \mu\text{L}$, de 2.00 a $20.00\ \mu\text{L}$, de 10.0 a $100.0\ \mu\text{L}$, de 20.0 a $200.0\ \mu\text{L}$, de 100 a $1000\ \mu\text{L}$ y de 1 a $10\ \text{mL}$.

Para la preparación de las fases móviles cromatográficas se utilizó agua ultrapura de resistividad $18.2\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, obtenida mediante un sistema de purificación de agua Milli-Q gradiente A-10 (Watford, Reino Unido) y ACN HiPerSolv Chromanorm grado LC. Las fases móviles se filtraron con filtros Millipore de $0.22\ \mu\text{m}$ suministrados por Sigma-Aldrich. Asimismo, se utilizó una jeringa Hamilton de $50\ \mu\text{L}$ (Reno, Nevada, Estados Unidos) para la inyección manual en el cromatógrafo.

Tabla 3.1. Estructuras y propiedades fisico-químicas de los analitos estudiados, obtenidas de la base de datos SciFinder® 2019.

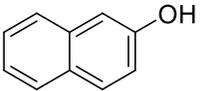
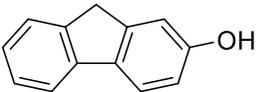
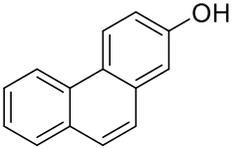
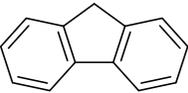
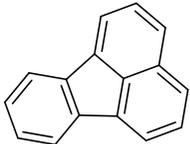
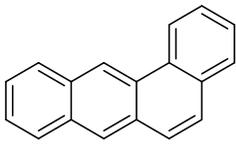
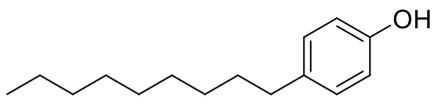
Analito (abreviatura)	Estructura química	Peso molecular (g·mol ⁻¹)	Presión de vapor a 25 °C (N·m ⁻²)	pK _a	Log K _{ow} *
OH-PAHs					
2-hidroxinaftaleno (2OHnap)		144.17	$2.2 \cdot 10^{-1}$	9.57	2.724
2-hidroxifluoreno (2OHflu)		182.22	$6.1 \cdot 10^{-4}$	9.94	3.646
2-hidroxifenantreno (2OHphe)		194.23	$5.4 \cdot 10^{-5}$	9.57	3.909
PAHs					
Fluoreno (Flu)		166.22	$4.0 \cdot 10^{-1}$	-	4.323

Tabla 3.1 (continuación).

Analito (abreviatura)	Estructura química	Peso molecular (g·mol ⁻¹)	Presión de vapor a 25 °C (N·m ⁻²)	pK _a	Log K _{ow} [*]
Fluoranteno (Ft)		202.25	2.3·10 ⁻³	-	5.004
Benzo[a]antraceno (BaA)		228.29	2.7·10 ⁻⁵	-	5.729
Alquilfenol					
4-nonilfenol (NnP)		220.35	1.1·10 ⁻²	10.15	6.142

* Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua a 25 °C

3.2. Aparatos e instrumentos

La síntesis del copolímero se llevó a cabo en un bloque metálico sobre una placa calefactora P Selecta[®] (Barcelona, España) con control de agitación magnética y temperatura. Para el procedimiento microextractivo, se utilizó una centrífuga modelo 5702 de Eppendorf[™] y un sistema de agitación por vortex Velp[®] Scientifica (Usmate, Italia).

El copolímero sintetizado se caracterizó por ¹H-RMN a temperatura ambiente, para lo cual se empleó un espectrómetro RMN AVANCE[™] (500 MHz) suministrado por Bruker (Massachusetts, Estados Unidos).

Para la separación y detección de los analitos se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos) modelo 1260 Infinity, con un sistema de detección de fluorescencia multicanal 1260 Infinity, también de Agilent, que permite trabajar simultáneamente con cuatro longitudes de onda de emisión fijando la de excitación (o con cuatro longitudes de onda de excitación fijando la de emisión). El cromatógrafo está equipado asimismo con una válvula de inyección manual de Agilent 5067-4191 y un *loop* de 5 μ L suministrado por Supelco. Se utilizó una columna cromatográfica InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 de tipo *core-shell* (150 mm \times 4.6 mm \times 4 μ m), suministrada por Agilent, y una precolumna Pelliguard LC-C18 (Supelco).

3.3. Software

Para el tratamiento del espectro RMN del copolímero, se empleó el *software* 1D-NMR-Processor de ACDLABS (v 12.0). El *software* utilizado en el análisis cromatográfico fue OpenLab ChemStation de Agilent, para el registro y el tratamiento de los cromatogramas obtenidos. Para realizar el diseño experimental se utilizó el Statgraphics[®] Centurion XV. Los cálculos estadísticos restantes se llevaron a cabo con Excel (Microsoft Office, v. 2016).

3.4. Procedimientos

3.4.1. Síntesis, purificación y caracterización del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico

La síntesis del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico, necesaria para la posterior generación del hidrogel, se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la bibliografía (78) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se mezclaron estireno (4.9 mmol, 568 μ L), anhídrido maleico (4.9 mmol, 485 mg) y AIBN (0.04 mmol, 6.5 mg) como iniciador radicalario en DMF (4 mL) como disolvente. La mezcla se realizó en un vial equipado con barra de agitación magnética y cerrado con tapa provista de septum. Seguidamente, la mezcla se purgó con N_2 seco durante 20 minutos y se introdujo en un bloque metálico precalentado a 70 °C. La reacción de polimerización se llevó a cabo a temperatura constante durante 14 horas y posteriormente se detuvo por enfriamiento en baño de agua y hielo.

El copolímero fue purificado por precipitaciones sucesivas utilizando dietiléter. Para ello, se añadió dietiléter hasta observar dos fases, se aplicó agitación magnética durante 10 minutos y se dejó reposar hasta que las fases se volvieron a separar. A continuación, se decantó la fase superior de dietiléter. El ciclo fue repetido 5 veces. Finalmente, el producto se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m y se secó a alto vacío ($7.00 \cdot 10^4$ N·m⁻²) a temperatura ambiente durante 8 horas.

En la Figura 3.1 se incluye un esquema del procedimiento de síntesis utilizado. Para la caracterización del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico por ¹H-RMN se utilizó DMSO-*d*₆ como disolvente. Los datos espectroscópicos obtenidos coincidieron con los descritos en la bibliografía (79).

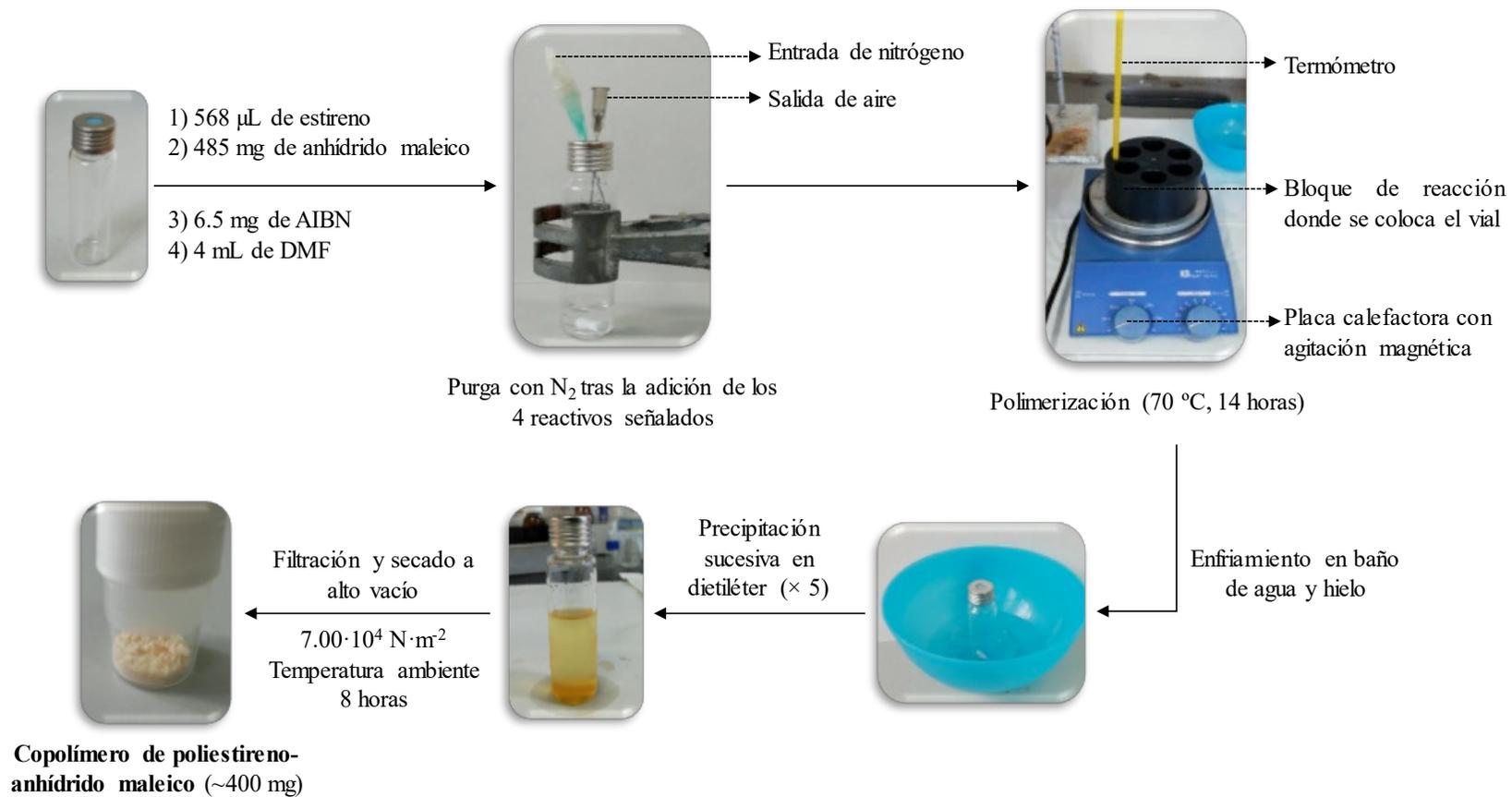


Figura 3.1. Procedimiento de síntesis del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico.

3.4.2. Método HPLC-FD

La separación cromatográfica de los analitos requirió una fase móvil constituida por ACN y agua ultrapura, a un flujo constante de 1 mL·min⁻¹. El gradiente de elución comenzó con un 60.0% (v/v) de ACN. A continuación, se aumentó progresivamente el porcentaje de ACN, alcanzando un 62.0% (v/v) en 5 minutos y llegando al 100% (v/v) a los 5.5 minutos. Este último porcentaje se mantuvo durante 6.5 minutos. De esta manera, se consiguió una separación cromatográfica de los analitos en 10 minutos.

Por otro lado, se diseñó un programa de fluorescencia para la detección de los analitos con la mayor sensibilidad posible. En primer lugar, se registró cada analito de forma individual para establecer su longitud de onda de excitación (λ_{ex}) y de emisión (λ_{em}) óptimas. A continuación, se ajustaron las condiciones para cada analito en los diferentes canales de fluorescencia del detector, manteniendo una λ_{em} constante para cada canal y variando solo la λ_{ex} a diferentes tiempos durante la separación. Los canales en los que se detectaron los diferentes analitos y sus λ_{ex} / λ_{em} óptimas a los tiempos cromatográficos adecuados se recogen en el programa de fluorescencia de la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Programa de fluorescencia empleado.

Tiempo (min)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)				Analitos	Ganancia
		A	B	C	D		
Inicio	225	350	315	386	460	-	8
2.00	225	*				2OHnap	12
3.25	273	*				2OHflu	12
3.85	259			*		2OHphe	12
7.00	262		*			Flu	12
8.10	235				*	Ft	12
8.60	277			*		BaA	12
8.85	226		*			NnP	12
10.00	-	-	-	-	-	-	8

* Canal en el que se registra cada analito con mayor sensibilidad

3.4.3. Microextracción con hidrogel sensible al cambio de pH (pH-HGME)

Las condiciones del procedimiento de microextracción se optimizaron cuidadosamente, persiguiendo siempre el adecuado control del pH para la formación del hidrogel como extractante, y un alto ratio de volúmenes de fases para asegurar una adecuada preconcentración. En las condiciones óptimas, se parte de 10 mL de un estándar acuoso (o muestra acuosa) que se colocan en un tubo de centrifuga. A continuación, se añaden 10 mg del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico disueltos en 150 μL de NaOH $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, y se agita vigorosamente. En ese momento, se genera *in situ* el hidrogel, soluble en agua.

Posteriormente, se añaden 200 μL de HCl $6.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se vuelve a agitar, observándose en este caso turbidez y formación de espuma debido a la insolubilización del hidrogel. Seguidamente, la mezcla se somete a agitación por vortex durante 3 minutos con objeto de favorecer el contacto entre los analitos y el hidrogel insolubilizado; y se centrifuga durante 15 minutos a $1921 \times g$ para mejorar la separación entre las fases. Se obtiene así una fase rica en hidrogel en el fondo del tubo conteniendo los analitos extraídos y preconcentrados. Finalmente, se decanta la fase acuosa, y la fase rica en hidrogel que queda en el fondo del tubo se diluye con 150 μL de ACN, se filtra, y se inyecta directamente en el HPLC-FD.

El procedimiento microextractivo óptimo desarrollado con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico se resume en la Figura 3.2.

3.4.4. Limpieza del material

Todo el material utilizado se sometió a un protocolo de limpieza exhaustivo. El material de vidrio volumétrico con el que se prepararon las disoluciones estándar e intermedias se limpió en primer lugar con agua corriente y jabón. A continuación, se utilizó una mezcla compuesta por ácido sulfúrico y Nochromix[®] (Laboratorios Godax Inc, proporcionado por Sigma-Aldrich), en la que se dejó el material un mínimo de 24 horas, y finalmente se enjuagó el mismo con agua ultrapura.

Por otra parte, para la limpieza del material de vidrio no volumétrico se utilizó agua corriente, jabón y agua destilada. Este material se sometió a un proceso de calentamiento en un horno a 550 °C durante 3 horas para eliminar restos de materia orgánica.

Por último, las tapas se sumergieron en una mezcla de agua corriente y metanol ($\geq 99.9\%$) suministrado por Honeywell Riedel-de Haën, y finalmente se enjuagaron con agua ultrapura.

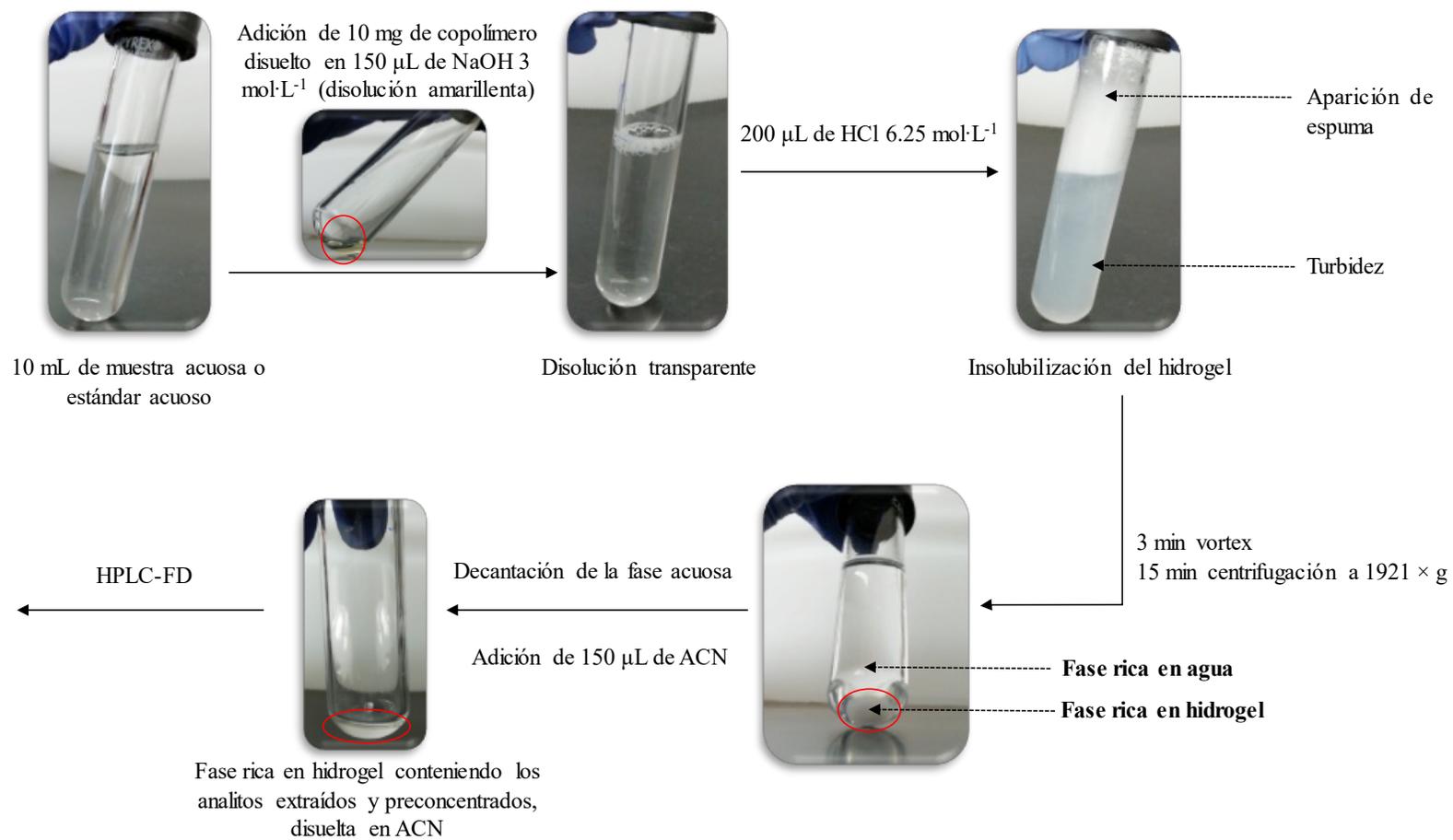


Figura 3.2. Procedimiento óptimo de microextracción con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico.

CAPÍTULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Preparación de un hidrogel sensible a los cambios de pH

4.1.1. Síntesis y caracterización del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico

El copolímero de poliestireno-anhídrido maleico se sintetizó según el procedimiento descrito en la sección 3.4.1 de la parte experimental, cuyo esquema procedimental resumido se muestra en la Figura 3.1. De un modo resumido, la reacción de síntesis es una co-polimerización de estireno con anhídrido maleico en presencia de DMF como disolvente y AIBN como iniciador radicalario (78).

La estructura del copolímero se confirmó por $^1\text{H-RMN}$, obteniéndose el espectro RMN que se muestra en la Figura 4.1. Las señales obtenidas en el espectro se asignaron a los diferentes hidrógenos presentes en la estructura polimérica según se describe en la bibliografía (79). La señal en torno a 1 ppm se asocia a los hidrógenos del grupo metilo del extremo terminal de la estructura, marcados como “a” en la Figura 4.1. Por otro lado, las señales entre 1.8 y 3 ppm se corresponden con los hidrógenos del carbono terciario (“c”) y del metileno (“d”) de la cadena principal del copolímero. La región del espectro señalada como “b” (7 – 7.6 ppm) se asocia a los hidrógenos aromáticos. Por último, los hidrógenos del residuo de anhídrido maleico “e” y “f” se corresponden con las señales presentes entre 3 y 3.5 ppm. Cabe destacar asimismo la presencia de varias impurezas del disolvente de síntesis (DMF, a 2.7 y 8 ppm), de agua a 3.5 ppm y de DMSO- d_6 a 2.5 ppm.

La concordancia entre las señales bibliográficas de RMN para el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico y las señales obtenidas en el espectro del producto sintetizado pone de manifiesto que la síntesis se llevó a cabo con éxito.

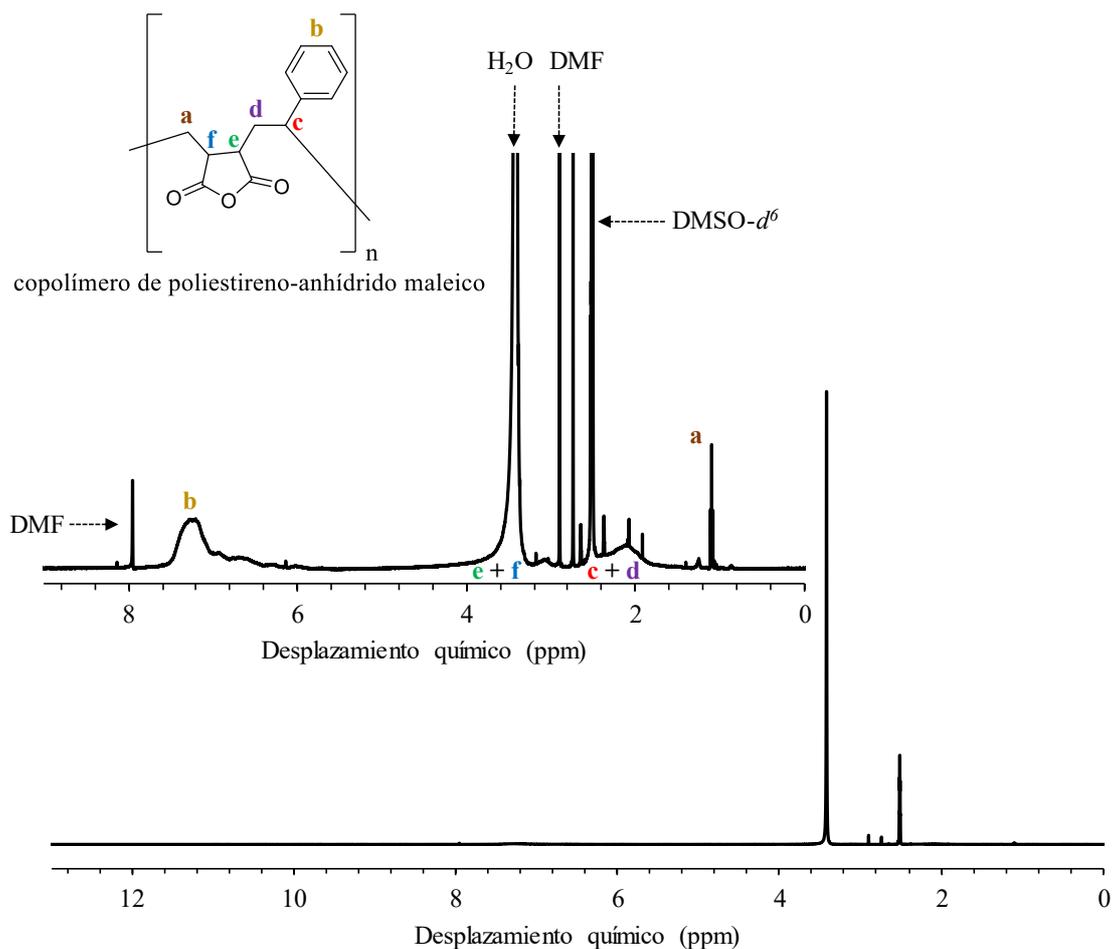


Figura 4.1. Espectro ¹H-RMN (500 MHz) del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico sintetizado, utilizando DMSO-*d*₆ como disolvente.

4.1.2. Evaluación preliminar de los cambios en disolución del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico debidos a modificaciones del pH

Para evaluar la utilización del copolímero sintetizado con fines microextractivos, se analizaron los cambios en su solubilidad en medio acuoso producidos por la variación del pH.

En la Figura 4.2 se presenta un esquema en el que se muestra la evolución de la estructura del copolímero en función del pH. En todo momento se dedujo la formación de las estructuras mostradas en la Figura 4.2 como explicación lógica de los cambios observados experimentalmente a medida que se modificaba el pH, teniendo en cuenta el

pK_a de los grupos funcionales presentes en la estructura del copolímero. El copolímero **1** es insoluble en agua ultrapura ($pH = 5.5$), y sin embargo es soluble en $NaOH\ 2\ mol\cdot L^{-1}$ ($pH = 10$). La solubilización a pH básico se justifica por la formación del producto **2** de la Figura 4.2, ya que se forma el dicarboxilato del copolímero por hidrólisis básica del anhídrido inicial. Cuando se añade a continuación $HCl\ 2\ mol\cdot L^{-1}$ al dicarboxilato generado, se observa la insolubilización del mismo por formación del producto **3** de la Figura 4.2, que es el diácido que se genera a partir de la protonación del dicarboxilato.

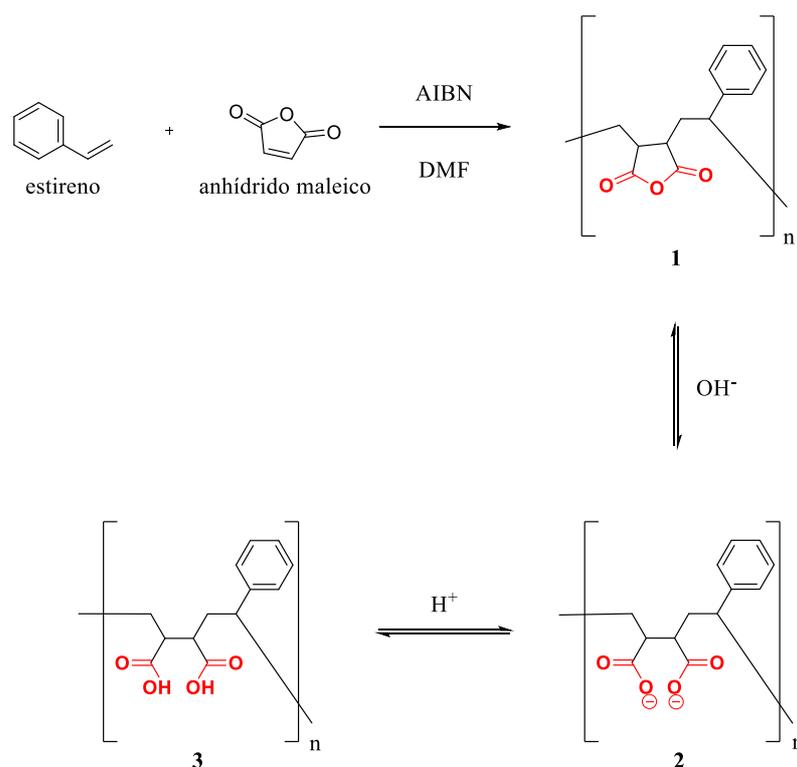


Figura 4.2. Preparación del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico y modificaciones de su estructura polimérica en respuesta a los cambios de pH : **1.** Copolímero de poliestireno-anhídrido maleico; **2. Dicarboxilato** del copolímero de poliestireno; y **3.** Copolímero de poliestireno-ácido maleico.

Estas pruebas preliminares permiten evaluar el comportamiento en agua del material sintetizado a diferentes valores de pH , tras la formación *in situ* de un hidrogel a partir del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico. La estructura del copolímero posibilita su insolubilización por simple protonación, generando un hidrogel que exhibe

una respuesta a los cambios de pH adecuada para el desarrollo de un método microextractivo. En la Figura 4.3 se observa un esquema de la generación del hidrogel sensible a los cambios de pH añadiendo a una muestra acuosa (o estándar acuoso) el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico disuelto en medio básico con NaOH. A continuación, un cambio de pH producido por adición de HCl protona el dicarboxilato y lo vuelve insoluble. Esta separación de fases puede emplearse como estrategia de preconcentración si el hidrogel es capaz de interactuar con los analitos inicialmente presentes en la muestra acuosa (o estándar acuoso).

4.2. Método cromatográfico

4.2.1. Separación cromatográfica

Se seleccionó un conjunto de 7 analitos: 3 PAHs, 3 OH-PAHs y NnP, todos ellos contaminantes medioambientales cuya determinación en muestras acuosas cobra especial importancia en la actualidad.

Los PAHs provienen de la combustión incompleta de sustancias orgánicas y son cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos. La volatilidad de este grupo de compuestos (Tabla 3.1) provoca que pasen fácilmente a la atmósfera y, con ello, se distribuyan con relativa facilidad en suelos, vegetación y ecosistemas acuáticos (80). Por su parte, los OH-PAHs son derivados monohidroxilados de los PAHs que presentan actividad disruptora endocrina y son inductores de numerosos tipos de cáncer. La facilidad con la que se pueden generar en la atmósfera a partir de la reacción entre los propios PAHs y el radical hidroxilo provoca una gran preocupación acerca de su persistencia en el medioambiente. Además, los OH-PAHs también se forman como metabolitos en seres vivos con alta exposición a PAHs (81). En cuanto al NnP, es un disruptor endocrino perteneciente a la familia de los alquilfenoles, con amplia distribución ambiental y de elevada toxicidad (82). Estructuralmente, todos poseen anillos aromáticos y fluorescencia natural, pero difieren en que por ejemplo los PAHs son altamente hidrofóbicos y no polares (altos valores de LogK_{ow}), mientras que los OH-PAHs se caracterizan por un mayor grado de polaridad (bajos valores de LogK_{ow}).

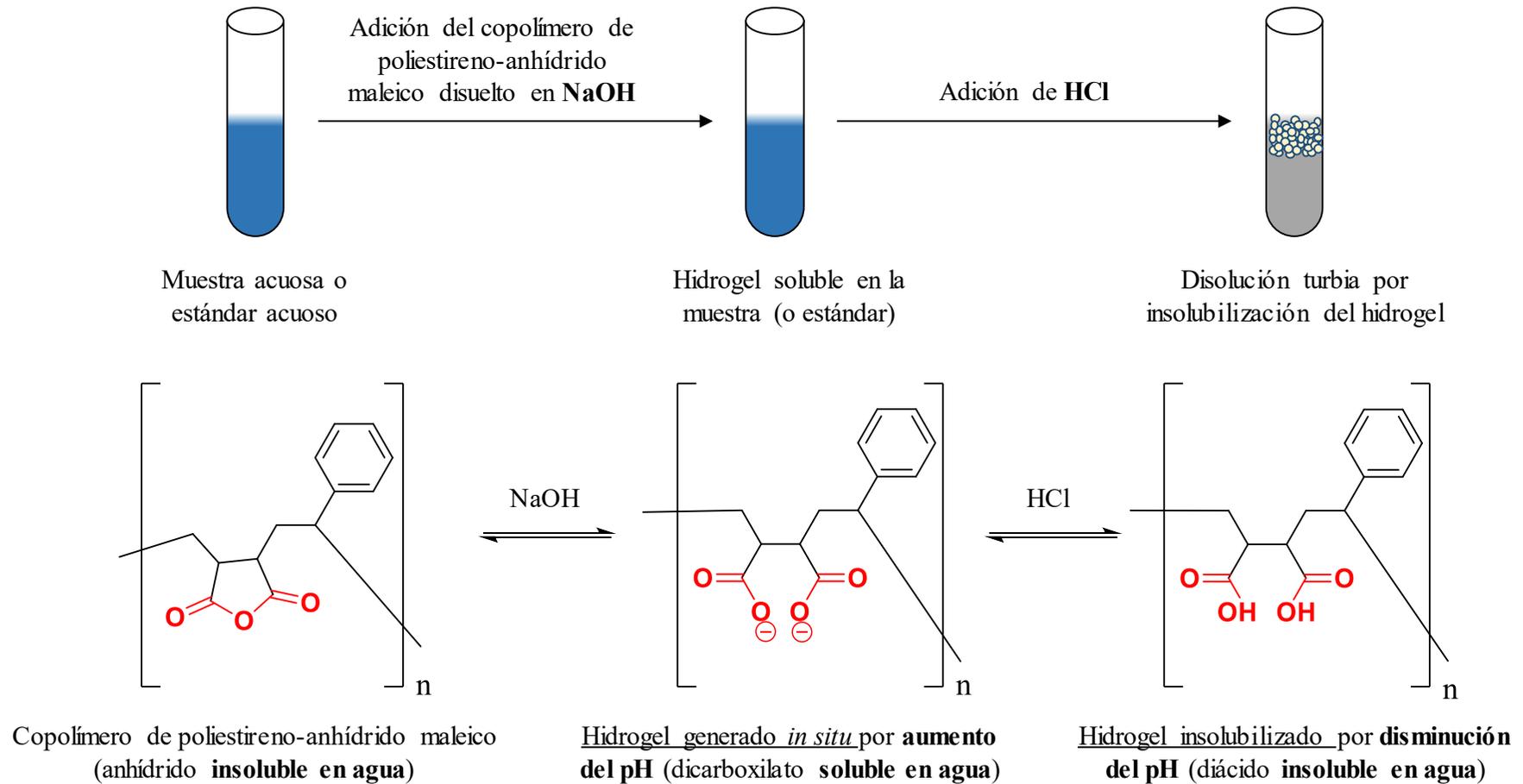


Figura 4.3. Generación de un hidrogel sensible a los cambios de pH a partir del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico.

La técnica de análisis seleccionada para la separación, detección y cuantificación de los analitos extraídos y preconcentrados en la fase rica en hidrogel fue la cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente (HPLC-FD).

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una fase móvil de ACN/agua ultrapura, optimizada mediante un conjunto de pruebas con distintos gradientes de elución. Asimismo, el programa de fluorescencia empleado para la detección de los analitos se optimizó teniendo en cuenta las longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas para cada uno de los analitos. Las condiciones cromatográficas finalmente seleccionadas se señalan en la sección 3.4.2. En las citadas condiciones óptimas, se obtuvo una adecuada separación de los 7 analitos estudiados en menos de 10 min, tal y como se observa en la Figura 4.4.

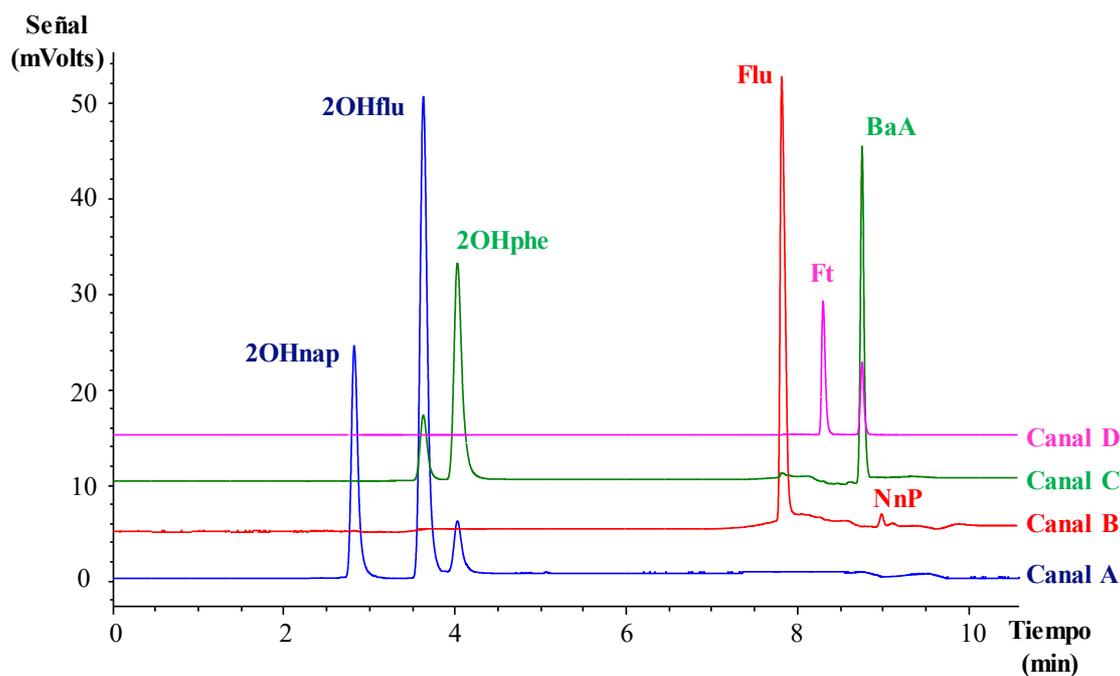


Figura 4.4. Cromatograma representativo obtenido con un estándar de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ conteniendo todos los analitos (en ACN) empleando las condiciones óptimas en el HPLC-FD. Para esta representación se ha realizado un desplazamiento del 10% entre las señales de los distintos canales de fluorescencia, de cara a facilitar su visualización.

En la Tabla 4.1 se incluye el orden de elución de los analitos estudiados, su tiempo de retención promedio y la precisión en los tiempos de retención, evaluada como

desviación estándar relativa (RSD, %) de inyecciones de estándares realizadas en varios días no consecutivos (n = 20).

Tabla 4.1. Orden de elución y precisión intermedia de los tiempos de retención en la separación cromatográfica optimizada en HPLC-FD.

Analitos	Orden de elución	Tiempo de retención promedio (min)	RSD* (%)
2OHnap	1	2.83	0.29
2OHflu	2	3.63	0.34
2OHphe	3	4.04	0.38
Flu	4	7.81	0.14
Ft	5	8.31	0.17
BaA	6	8.77	0.24
NnP	7	9.01	0.29

* Desviación estándar relativa inter-día de los tiempos de retención (n = 20)

4.2.2. Validación del método HPLC-FD

La validación del método cromatográfico se llevó a cabo utilizando estándares en ACN, incluyéndose varios parámetros analíticos de calidad obtenidos en la Tabla 4.2.

Como se puede apreciar, los coeficientes de correlación (R) son en todos los casos iguales o superiores a 0.996, por lo que el método HPLC-FD presenta *a priori* una adecuada linealidad, verificada asimismo por medio de un test *t* de Student (83). La hipótesis nula que se plantea es la inexistencia de correlación entre “x” e “y” en el modelo lineal. Los valores calculados de *t* (*t*_{cal}) se obtuvieron aplicando la Ecuación 1,

$$t_{\text{cal}} = \frac{|R| \cdot \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - R^2}}$$

Ecuación 1

siendo *R* el coeficiente de correlación y *n* el número de niveles de calibración.

Tabla 4.2. Parámetros analíticos de calidad y precisión intermedia del método cromatográfico HPLC-FD para los analitos estudiados.

Analito	Rango de calibración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	($b \pm t\cdot\text{SD}^a$)	R^b	$S_{y/x}^c$	LOD ^d ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ ^e ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rango de RSD intra- día ^f (%)	RSD inter-día ^g (%)
2OHnap	1 – 75	6.44 ± 0.15	0.999	4.1	0.090	0.30	2.8 – 5.7	6.8
2OHflu	1 – 50	13.9 ± 0.7	0.999	10.6	0.010	0.060	3.2 – 5.8	5.3
2OHphe	1 – 75	7.39 ± 0.17	0.999	4.6	0.060	0.20	2.8 – 5.8	6.3
Flu	1 – 50	9.21 ± 0.34	0.999	5.1	0.20	0.70	2.0 – 4.7	6.6
Ft	1 – 75	1.94 ± 0.05	0.999	1.3	0.060	0.20	2.2 – 5.9	5.1
BaA	1 – 75	4.73 ± 0.11	0.999	3.0	0.030	0.10	4.1 – 5.9	6.6
NnP	5 – 100	0.275 ± 0.035	0.996	1.1	0.75	2.5	4.3 – 5.3	6.4

^a Intervalo de confianza de la pendiente para $n = 7$ y un nivel de significación de 0.05

^b Coeficiente de correlación

^c Desviación estándar de los residuos

^d Límite de detección, obtenido experimentalmente mediante disminución de la concentración de los estándares inyectados hasta obtener una relación señal/ruido (S/N) de 3

^e Límite de cuantificación, estimado como (10/3) del límite de cuantificación y comprobado experimentalmente mediante la inyección de estándares a las concentraciones predichas

^f Rango de desviaciones estándar relativas intra-día de las áreas de pico obtenidas con un estándar de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 4$)

^g Desviación estándar relativa inter-día de las áreas de pico obtenidas con un estándar de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 12$, 3 días no consecutivos)

Teniendo en cuenta el valor de t crítico ($t_{\text{crit}} = 2.57$) para 5 grados de libertad ($n = 7$ niveles de calibración) y un nivel de significación de 0.05, se rechaza la hipótesis nula, pues los valores de t_{cal} obtenidos con la Ecuación 1 oscilan entre 24.1 para NnP y 112 para 2OHphe, siendo en todos los casos mayores que t_{crit} . Por tanto, el método cromatográfico optimizado presenta buena linealidad para los analitos seleccionados.

Por otro lado, las desviaciones estándar de los residuos ($S_{y/x}$) oscilan entre 1.1 para NnP y 10.6 para 2OHflu. La sensibilidad, expresada como sensibilidad de calibración, es máxima para el 2OHflu, mientras que es mínima para el NnP.

Los límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs) se determinaron experimentalmente. Así, los LODs se obtuvieron inyectando estándares de concentraciones cada vez más pequeñas hasta que la relación señal/ruido (S/N) fuera de 3, mientras que los LOQs se determinaron por estimación, a partir de (10/3) de los LODs, y posteriormente se verificaron experimentalmente mediante estándares a las concentraciones predichas. Los LODs así estimados se encuentran entre $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el 2OHflu y $0.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el NnP.

Por otra parte, la precisión del método cromatográfico se evaluó con un estándar de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que es una concentración perteneciente al rango de calibración de todos los analitos, pero que no se utilizó para la obtención de las curvas de calibrado. Se calculó en primer lugar la RSD (%) para las áreas de pico obtenidas en inyecciones realizadas un mismo día ($n = 4$). En la Tabla 4.2 se pueden observar los diferentes rangos de RSD intra-día para todos los analitos, encontrándose en todos los casos valores inferiores al 6.0%. Por otro lado, se evaluó la precisión inter-día mediante inyecciones realizadas en 3 días no consecutivos ($n = 12$), obteniéndose valores de RSD inter-día para las áreas de pico adecuados en todos los casos, que oscilan entre 5.1% para Ft y 6.8% para 2OHnap.

4.3. Hidrogel sensible a los cambios de pH en microextracción analítica

4.3.1. Pruebas preliminares de microextracción con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico

El hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico se utilizó como base para el desarrollo de un método de microextracción y preconcentración de los 7 analitos mencionados en la sección 4.2. Como prueba inicial de verificación de la capacidad del copolímero de generar eficientemente un hidrogel, y paralelamente extraer y preconcentrar *in situ* el conjunto de analitos mediante un cambio de pH, se añadió el copolímero disuelto en NaOH a un estándar acuoso conteniendo los analitos. Tras añadir HCl y observar la insolubilización del hidrogel, la mezcla se sometió a agitación por vortex y posterior centrifugación, formándose una fase rica en hidrogel. La fase rica en hidrogel obtenida se disolvió por completo en ACN, garantizando de esta manera la compatibilidad con la fase móvil del sistema HPLC-FD. La presencia de los analitos (extraídos y preconcentrados) en la fase rica en hidrogel diluida en ACN se confirmó cromatográficamente.

A continuación, se evaluaron las variables que podían tener influencia en el método microextractivo, llevando a cabo un conjunto de pruebas preliminares en las que se estudió la eficacia extractiva del método para cada uno de los analitos bajo diferentes condiciones. En la Figura 4.5 se observa el esquema inicial del proceso microextractivo estudiado.

Se observó que la concentración de HCl añadida para insolubilizar el hidrogel ejercía una gran influencia en la eficacia extractiva, lo cual resulta lógico si se considera que el pH debe ser suficientemente ácido para protonar el dicarboxilato y asegurar la insolubilización del hidrogel con los analitos extraídos y preconcentrados (Ver Figura 4.3). Asimismo, se debe asegurar la adición de un mínimo de copolímero para generar suficiente hidrogel en el procedimiento microextractivo (capaz de interactuar adecuadamente en disolución con los analitos), de manera que la cantidad que quede de hidrogel sin solubilizar debe ser despreciable y, por otra parte, la cantidad de hidrogel insoluble debe ser la menor posible para asegurar un elevado factor de preconcentración.

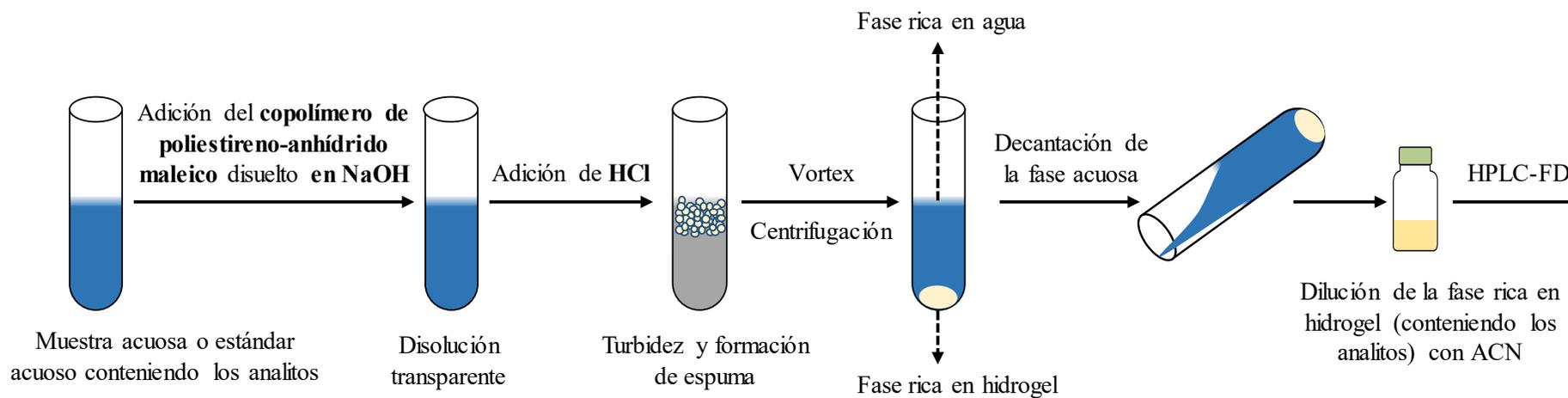


Figura 4.5. Esquema inicial del procedimiento de microextracción haciendo uso de hidrogel sensible a los cambios de pH.

En este sentido, los factores que *a priori* tienen mayor influencia en el método microextractivo son, por un lado, la concentración de HCl, y, por otro, la cantidad de copolímero. Los valores del resto de las variables se fijaron a aquellos valores que se consideraron aceptables de acuerdo con el conjunto de pruebas preliminares. La Tabla 4.3 recoge las diferentes variables evaluadas y los valores fijados. Así, el volumen de muestra acuosa (o estándar acuoso) se fijó en 10 mL por similitud con los volúmenes comúnmente utilizados en microextracción, de manera que exista una diferencia de volumen significativa entre la muestra acuosa (o estándar acuoso) inicial y la fase rica en hidrogel final, de modo que se garantice la preconcentración de los analitos. Por otro lado, el volumen y la concentración de NaOH se escogieron con el propósito de utilizar la cantidad mínima posible de este reactivo capaz de solubilizar el copolímero. En cuanto al tiempo de vortex y tiempo de centrifugación, se seleccionaron los mínimos necesarios para que se produjera la completa separación entre la fase rica en agua y la fase rica en hidrogel. Así, para tiempos de centrifugación inferiores a 15 minutos, se observó dispersión del hidrogel en la fase rica en agua. Por último, el volumen de ACN utilizado para obtener el extracto final fue el mínimo necesario para solubilizar la fase rica en hidrogel, y evitar una dilución innecesaria que reduzca la preconcentración alcanzada.

Tabla 4.3. Variables que tienen influencia en el método de microextracción haciendo uso de un hidrogel sensible a los cambios de pH, así como sus valores fijados o estudiados.

Variable	Valor
Volumen de muestra acuosa o estándar acuoso (mL)	10
Cantidad inicial de copolímero (mg)	*
Concentración de NaOH ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	3
Volumen de NaOH (μL)	150
Concentración de HCl ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	*
Volumen de HCl (μL)	200
Tiempo de vórtex (min)	3
Velocidad de centrifugación ($\times g$)	1921
Tiempo de centrifugación (min)	15
Volumen de ACN usado en la dilución de la fase rica en hidrogel (μL)	150

* Variable a optimizar

4.3.2. Optimización del método de microextracción con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico

Para la optimización del método microextractivo, se utilizó un diseño experimental de dos factores (con las dos variables a optimizar anteriormente señaladas). El método quimiométrico empleado para la obtención de los valores óptimos de las variables evaluadas fue el de la matriz de Doehlert (84).

En primer lugar, se calculó el número de experiencias a realizar en el diseño experimental utilizando la Ecuación 2 (84),

$$N = k^2 + k + C_0$$

Ecuación 2

siendo N es número de experiencias totales, k el número de variables ($k = 2$ en este caso) y C_0 el número de experiencias en las que se repite el punto central ($C_0 = 3$).

Atendiendo a los resultados de las pruebas preliminares, el factor “concentración de HCl” fue seleccionado como el que ejerce una mayor influencia en el método, por lo que se evaluó a 5 niveles, mientras que el factor “cantidad de copolímero” se evaluó a 3 niveles. Para la obtención de los valores de los diferentes niveles para cada factor, se utilizó la Ecuación 3 (84),

$$C_i = \left\{ \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \right\} \cdot \alpha$$

Ecuación 3

donde C_i son los valores codificados de Doehlert para el diseño de dos factores; X_i^0 es el valor real en el centro del dominio experimental; ΔX_i es la variación del valor real, calculada con la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo con respecto al valor central; α es el valor límite codificado para cada factor (1 para la variable que más influye

y 0.866 para la variable que menos influye); y X_i son los valores reales de los factores en las experiencias a realizar.

La matriz de Doehlert con los valores codificados para el diseño de dos factores y los valores de X_i obtenidos para los diferentes niveles de cada factor se recogen en la Tabla 4.4. Como se puede apreciar, se realizaron 9 experiencias, en las que se evaluaron 5 niveles de “concentración de HCl”, entre $2.50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $7.50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; y 3 niveles de “cantidad de copolímero”, que oscilaron entre 3.00 mg y 10.0 mg. Los límites de los rangos evaluados para cada factor fueron seleccionados en base a las tendencias observadas en las pruebas preliminares.

Tabla 4.4. Matriz de Doehlert para dos factores y niveles evaluados de las variables optimizadas en el diseño experimental.

Experiencia	$C_{HCl}^a(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		$m_{\text{copolímero}}^b \text{ (mg)}$	
	C_1^c	X_1^d	C_2^e	X_2^f
1*	0	5.00	0	6.50
2	1	7.50	0	6.50
3	0.5	6.25	0.866	10.0
4	-1	2.50	0	6.50
5	-0.5	3.75	-0.866	3.00
6	0.5	6.25	-0.866	3.00
7	-0.5	3.75	0.866	10.0
8*	0	5.00	0	6.50
9*	0	5.00	0	6.50

* Punto central, realizado por triplicado

^a Variable con mayor influencia (Factor 1): “Concentración de HCl”, evaluada a 5 niveles

^b Variable con menor influencia (Factor 2): “Cantidad de copolímero”, evaluada a 3 niveles

^c Valores codificados de Doehlert para los niveles del factor 1

^d Valores reales para el factor 1 en las experiencias realizadas

^e Valores codificados de Doehlert para los niveles del factor 2

^f Valores reales para el factor 2 en las experiencias realizadas

Los resultados obtenidos en el diseño experimental se ajustaron a una superficie de respuesta que es función de los dos factores a optimizar, y cuya expresión genérica viene dada por la Ecuación 4,

$$Y = k + A \cdot [C_{\text{HCl}}] + B \cdot [m_{\text{copolímero}}] + AA \cdot [C_{\text{HCl}}]^2 + AB \cdot [C_{\text{HCl}}] \cdot [m_{\text{copolímero}}] + BB \cdot [m_{\text{copolímero}}]^2$$

Ecuación 4

siendo k una constante, A el coeficiente asociado a la variable de mayor influencia “concentración de HCl”, B el coeficiente del factor “cantidad de copolímero”, AA el coeficiente del cuadrado de la variable A , AB el coeficiente asociado a la interacción entre los dos factores y BB el coeficiente del cuadrado de la variable B . Los coeficientes toman diferentes valores para cada analito, por lo que cada uno de ellos tiene una superficie de respuesta característica definida por la Ecuación 4. En la Tabla 4.5 se recogen los coeficientes de la superficie de respuesta para cada analito, los parámetros de regresión del modelo y los valores optimizados de las dos variables evaluadas haciendo uso de las superficies de respuesta obtenidas. Como se puede observar, los valores del coeficiente de determinación (R^2) son elevados y están comprendidos entre 91.8% para el 2OHnap y 99.5% para BaA.

En la Figura 4.6 se observa la representación gráfica de las superficies de respuesta de todos los analitos definidas según la Ecuación 4, con los coeficientes recogidos en la Tabla 4.5. La eficacia extractiva durante el diseño experimental se monitorizó con las áreas de pico obtenidas en el HPLC-FD tras realizar el método microextractivo en las condiciones de las 9 experiencias evaluadas. En la representación de la Figura 4.6, los colores más cálidos (amarillo y naranja) de las superficies de respuesta se corresponden con las mayores áreas de pico registradas, por lo que fácilmente se aprecia que no existen diferencias significativas entre los analitos, ya que en todos los casos los máximos de las superficies de respuesta se encuentran en el valor más alto evaluado de “cantidad de copolímero” (10.0 mg), con una “concentración de HCl” que varía entre 5.50 mol·L⁻¹ para el NnP y 6.25 mol·L⁻¹ para el 2OHnap. Los máximos observados se asocian con los valores óptimos recogidos en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Coeficientes y parámetros de regresión de las superficies de respuesta, así como los valores óptimos de las variables evaluadas con el diseño experimental de Doehlert.

Analito	k	A	B	AA	AB	BB	R ^{2a} (%)	S _{y/x} ^b	C _{HCl} óptima ^c (mol·L ⁻¹)	m _{copolímero} ^d óptima (mg)
2OHnap	-67.5	34.2	-4.60	-2.60	-0.176	0.901	91.8	10.3	6.25	10.0
2OHflu	-957	376	12.8	-28.7	-3.26	4.95	96.7	60.8	5.97	10.0
2OHphe	-946	399	14.3	-30.5	-4.69	3.71	96.7	48.9	5.77	10.0
Flu	-986	407	20.9	-31.7	-5.20	3.59	95.8	55.1	5.60	10.0
Ft	-358	166	2.19	-12.5	-2.46	1.35	97.9	12.8	5.62	10.0
BaA	-814	422	-27.6	-33.7	-3.20	4.93	99.5	16.9	5.79	10.0
NnP	-36.2	14.0	1.56	-1.03	-0.263	0.0596	97.5	1.26	5.50	10.0

^a Coeficiente de determinación

^b Desviación estándar de los residuos

^c Valor óptimo para la “concentración de HCl”

^d Valor óptimo para la “cantidad de copolímero”

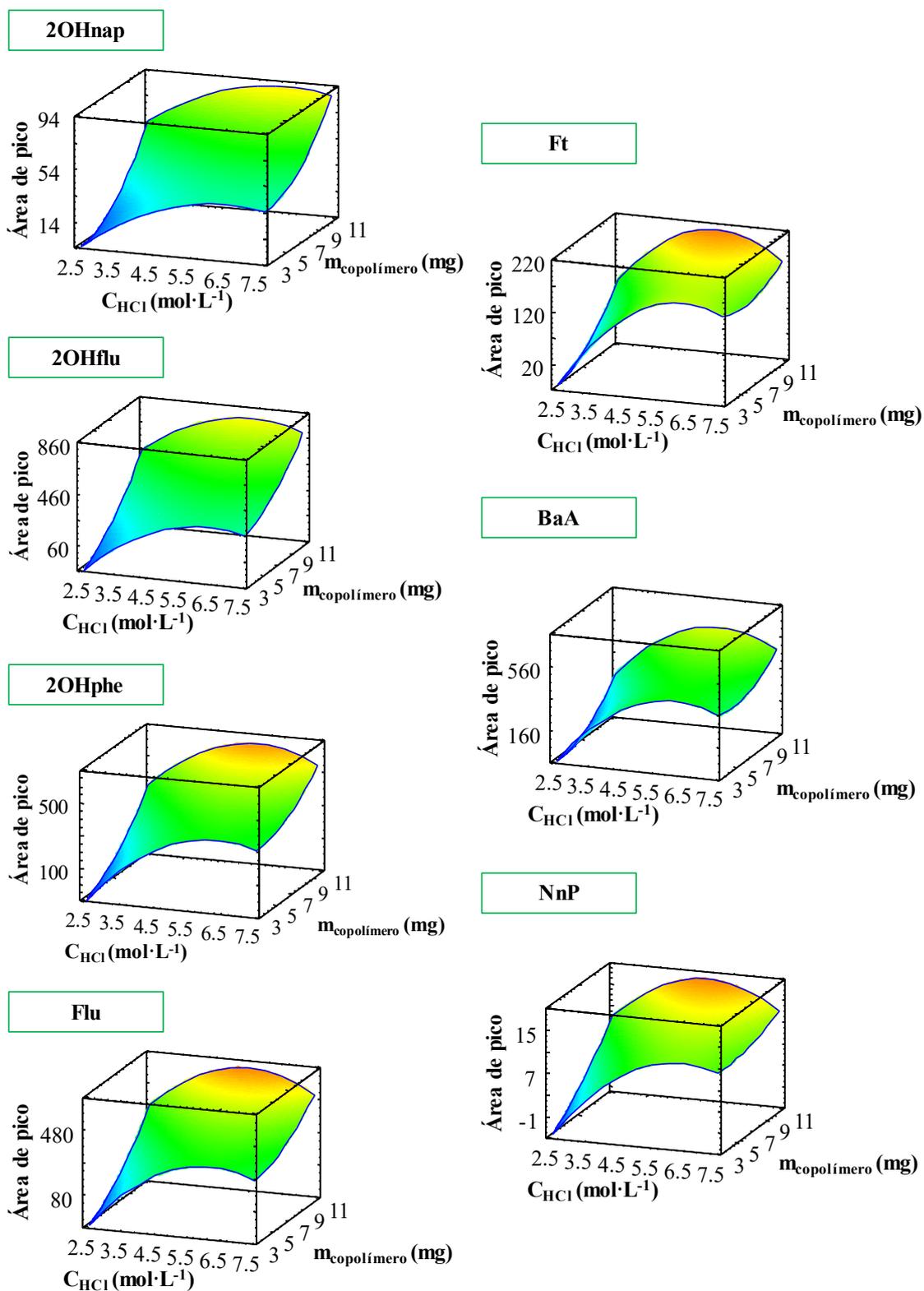


Figura 4.6. Superficies de respuesta obtenidas en el diseño experimental por matriz de Doehlert para cada uno de los analitos.

El diseño experimental realizado permitió evaluar, asimismo, los efectos principales de las dos variables optimizadas en el método microextractivo. Las gráficas recogidas en la Figura 4.7 muestran la influencia de ambas variables en las áreas de pico de cada analito obtenidas en el HPLC-FD tras aplicación del método completo de microextracción.

Cabe destacar que, para la concentración de $2.50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCl, correspondiente a la experiencia 4 de la Tabla 4.4, no se insolubilizó el hidrogel, por lo que no se pudo obtener una fase rica en hidrogel con los analitos extraídos y preconcentrados, de ahí que el área de pico asociada a este punto sea 0. Se ha comprobado, por tanto, que esta concentración de HCl es insuficiente para protonar el dicarboxilato y por tanto no tiene lugar la insolubilización necesaria para la formación de las dos fases. Asimismo, en la Figura 4.7 se puede apreciar que, para la concentración de $7.50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, las áreas de pico disminuyen. En esta experiencia ($7.50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCl), se observó que el volumen de ACN añadido a la fase rica en hidrogel fue insuficiente para lograr su completa solubilización, explicándose de esta manera la disminución de eficacia extractiva en un medio muy ácido. Es por ello que la “concentración de HCl” presenta un máximo en valores que suponen un medio ácido suficientemente fuerte para garantizar la insolubilización del hidrogel, pero no demasiado ácido para que la elevada concentración de iones Cl^- no afecte a la solubilidad final de la fase rica en hidrogel.

En base a los resultados obtenidos en el diseño experimental, se decidió escoger $6.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ como concentración de HCl a utilizar en el método de microextracción, la óptima para el analito con menor eficacia extractiva (2OHnap). La elección se basa en favorecer al analito cuyas áreas de pico obtenidas en el diseño experimental son menores, lo que se puede asumir sin una pérdida significativa de eficacia para los analitos restantes, como se muestra en la Tabla 4.6. Se calculó el porcentaje de variación en el área de pico para cada analito al sustituir la concentración de $6.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCl en la Ecuación 4, con respecto a los valores obtenidos al tomar la concentración óptima de HCl para cada uno de los analitos. Se obtuvo una disminución general aceptable en las áreas de pico, siendo los porcentajes de variación inferiores al 4% en todos los casos.

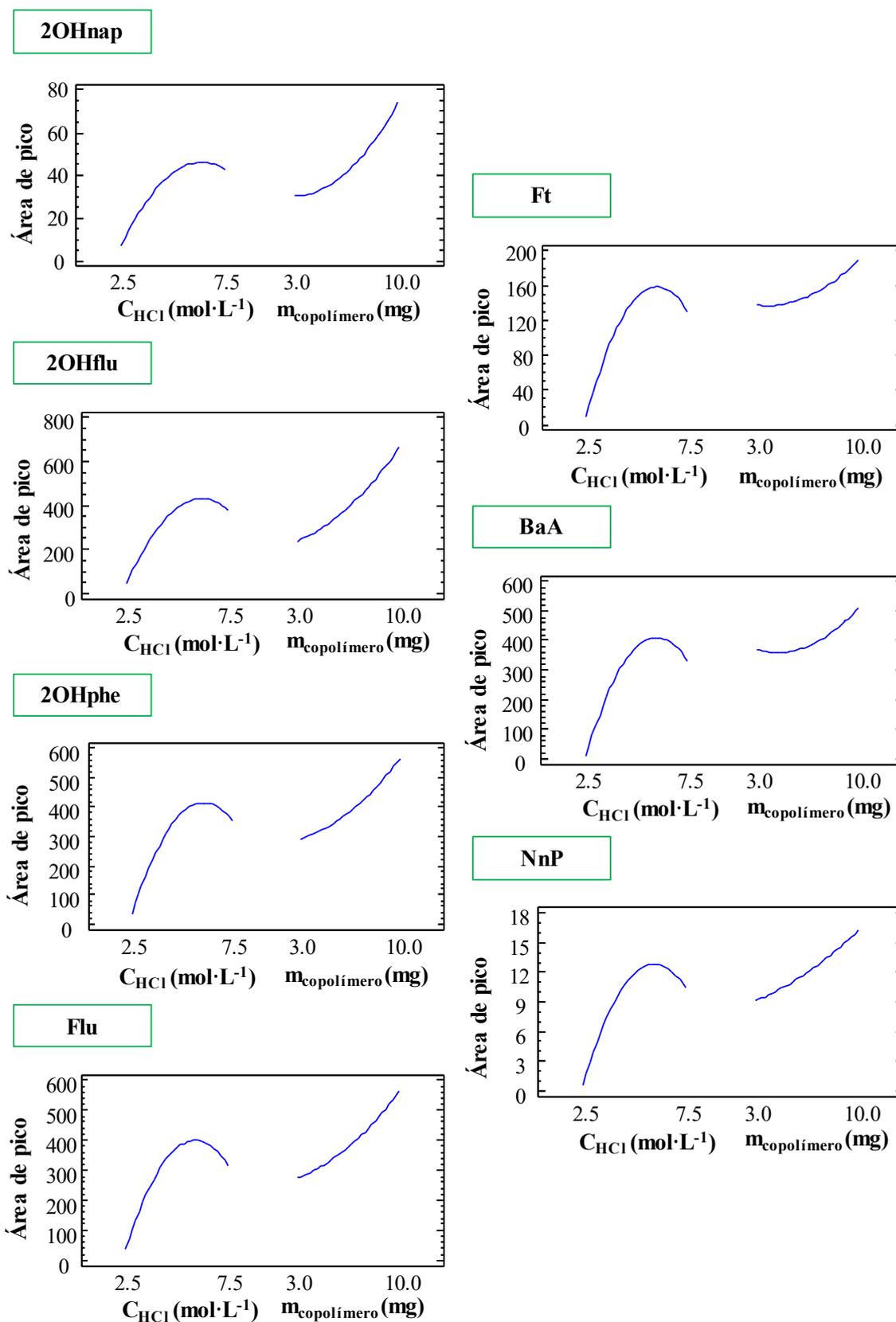


Figura 4.7. Efectos principales de las dos variables evaluadas en el diseño experimental para cada uno de los analitos.

Tabla 4.6. Elección de la concentración óptima de HCl en el método de microextracción con hidrogel sensible a los cambios de pH.

Analito	Respuesta 1 ^a	Respuesta 2 ^b	% Variación
2OHnap	78.3	78.3	0
2OHflu	691	689	-0.3
2OHphe	584	577	-1
Flu	577	563	-2
Ft	194	189	-3
BaA	534	526	-1
NnP	16.5	15.9	-4

^a Respuesta obtenida aplicando la Ecuación 4 con las concentraciones de HCl óptimas para cada analito (recogidas en la Tabla 4.5).

^b Respuesta obtenida aplicando la Ecuación 4 con la máxima concentración de HCl, correspondiente a la óptima del analito 2OHnap ($6.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

^c Porcentaje de variación de la Respuesta 2 frente a la Respuesta 1.

Por otro lado, el efecto observado para la variable “cantidad de copolímero” en la Figura 4.7 muestra una tendencia de aumento de área de pico a medida que se incrementa la cantidad de copolímero, obteniendo un máximo para todos los analitos en 10.0 mg. Esta tendencia es lógica, pues cuanto mayor es la cantidad de material de partida, más hidrogel se puede generar para extraer los analitos. En este sentido, se eligió dicha cantidad como óptima (10.0 mg). Cabe destacar que las tendencias observadas en el diseño experimental sugieren que, si se sigue aumentando la cantidad de copolímero, se podrían obtener incluso mayores eficacias de extracción. No obstante, dado que los métodos de microextracción se caracterizan por la utilización de la mínima cantidad posible de material de extracción, no se evaluaron cantidades superiores. Asimismo, el uso de un exceso de copolímero podría provocar que el HCl no fuese suficiente para insolubilizar la totalidad del hidrogel, con lo que se utilizarían grandes cantidades de material y probablemente se produciría una disminución de la eficacia extractiva.

La Figura 4.8 muestra un esquema del procedimiento microextractivo optimizado con el hidrogel sensible a los cambios de pH (pH-HGME) utilizado en este estudio.

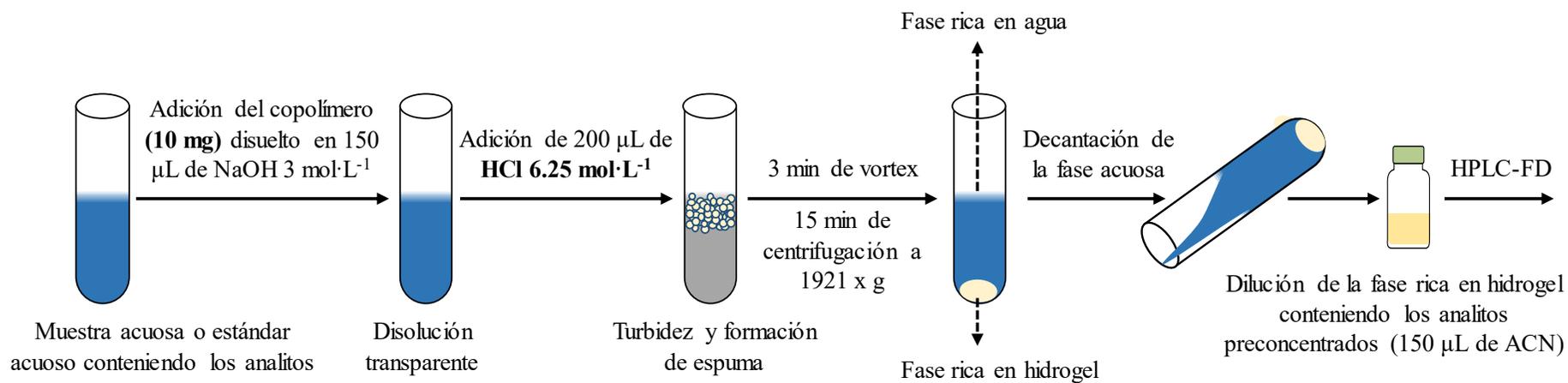


Figura 4.8. Esquema inicial del procedimiento de microextracción haciendo uso de hidrogeles sensibles a los cambios de pH.

4.4. Validación del método total pH-HGME-HPLC-FD

La validación del método analítico total pH-HGME-HPLC-FD se llevó a cabo mediante la utilización de estándares acuosos con diferentes concentraciones de los analitos estudiados, sometidos al método total optimizado pH-HGME-HPLC-FD.

En la Tabla 4.7 se recogen varios parámetros analíticos de calidad del método pH-HGME-HPLC-FD: el rango de calibración; las pendientes de las curvas de calibrado; los coeficientes de correlación (R); las desviaciones estándar de los residuos ($S_{y/x}$); los límites de detección (LODs), obtenidos experimentalmente disminuyendo la concentración de los estándares acuosos sometidos al método pH-HGME-HPLC-FD hasta obtener una relación señal/ruido (S/N) de 3; y los límites de cuantificación (LOQs), que fueron calculados como 10/3 de los LODs y comprobados experimentalmente.

El rango de calibración fue de 0.1 a 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para todos los analitos, exceptuando el 2OHnap (0.3 – 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y el NnP (0.5 – 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La sensibilidad, expresada como sensibilidad de calibración, al igual que en el método HPLC-FD (ver Tabla 4.2), es máxima para el 2OHflu, mientras que es mínima para el NnP. En cuanto a los valores de $S_{y/x}$, son en todos los casos inferiores a 8.7.

La linealidad del método desarrollado se evaluó a partir de los valores de R , siendo en todos los casos superiores a 0.997, y utilizando el test t de Student propuesto por Miller (83). El valor de t_{crit} para 4 grados de libertad ($n = 6$ niveles de calibración) y un nivel de significación de 0.05% es de 2.78. Los valores de t_{cal} están comprendidos entre 26.2 para BaA y 61.9 para 2OHflu, con lo que se cumple que $t_{\text{cal}} > t_{\text{crit}}$ para todos los analitos, rechazando la hipótesis nula y confirmando la adecuada linealidad del método.

Es importante señalar la gran sensibilidad que presenta el método pH-HGME-HPLC-FD optimizado, dados los bajos valores de LODs obtenidos, del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Así, los LODs están comprendidos entre 1.0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para 2OHflu y BaA y 90 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para el NnP. La preconcentración conseguida con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico se pone de manifiesto si se comparan los LODs del método total (Tabla 4.7) con los LODs del método cromatográfico (Tabla 4.2).

Tabla 4.7. Parámetros analíticos de calidad del método total pH-HGME-HPLC-FD, empleando estándares en agua ultrapura.

Analito	Rango de calibración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	($b \pm t \cdot \text{DS}^a$)	R^b	$S_{y/x}^c$	LOD ^d ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ ^e ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
2OHnap	0.3 – 3	17 ± 2	0.998	1.3	0.03	0.1
2OHflu	0.1 – 3	138 ± 4	0.999	4.7	0.001	0.004
2OHphe	0.1 – 3	117 ± 5	0.999	4.8	0.004	0.01
Flu	0.1 – 3	117 ± 5	0.999	4.9	0.02	0.06
Ft	0.1 – 3	38 ± 3	0.999	2.5	0.003	0.01
BaA	0.1 – 3	93 ± 10	0.997	8.7	0.001	0.004
NnP	0.5 – 5	3.1 ± 0.3	0.998	0.4	0.09	0.3

^a Intervalo de confianza de la pendiente para $n = 6$ y un nivel de significación de 0.05

^b Coeficiente de correlación

^c Desviación estándar de los residuos

^d Límite de detección, determinado experimentalmente disminuyendo la concentración de los estándares acuosos sometidos al método pH-HGME-HPLC-FD hasta obtener una relación señal/ruido (S/N) de 3.

^e Límite de cuantificación, estimado como 10/3 del LOD y verificado experimentalmente inyectando los extractos resultantes de aplicar el método pH-HGME-HPLC-FD a estándares acuosos de las concentraciones predichas.

Así, por ejemplo, con el método pH-HGME-HPLC-FD se alcanza un LOD 10 veces menor que el LOD del método HPLC-FD para el 2OHflu, e incluso llega a ser aproximadamente 100 veces menor en el caso del 2OHphe. Asimismo, como se puede observar en la Tabla 4.7, los LODs son en general menores para los analitos de mayor peso molecular dentro de una familia determinada (ver Tabla 3.1). El OH-PAH más ligero (2OHnap) tiene el mayor LOD ($30 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) de los OH-PAHs estudiados, así como el Flu es el menos sensible de los PAHs (LOD de $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) y a la vez el más ligero de todos ellos.

En este punto, es importante comparar el método desarrollado con otros métodos de microextracción descritos en la bibliografía que utilicen HPLC-FD para la determinación de algunos de los analitos estudiados en este trabajo. La comparativa se recoge en la Tabla 4.8. No existe hasta la fecha ningún artículo en el que se hayan determinado simultáneamente los analitos del presente estudio, pero sí se han analizado por separado, junto con otros pertenecientes a su misma familia. Así, para la determinación de PAHs se han utilizado diferentes materiales de extracción, como por ejemplo derivados de ILs en estrategias de extracción en fase líquida (85) o sorbentes magnéticos en estrategias de extracción en fase sólida (86). En el caso de los OH-PAHs, dado que son marcadores cancerígenos en orina, los métodos de microextracción se han dirigido fundamentalmente a su determinación en dicha matriz utilizando novedosos materiales (9). El NnP, por su parte, se ha determinado por HPLC-FD junto con otros fenoles fluorescentes (87). El método pH-HGME-HPLC-FD presenta LODs del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para el conjunto de analitos estudiados, al igual que otros métodos recogidos en la Tabla 4.8 para algunos de estos analitos, en los que se señalan LODs que oscilan entre $0.75 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (86) y $350 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (87). Cabe destacar que con el método desarrollado se alcanza un LOD menor para el NnP ($90 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) que el que es comúnmente obtenido para este analito por HPLC-FD (87). Con el método pH-HGME-HPLC-FD se utiliza una pequeña cantidad de material de extracción (pocos mg de copolímero para generar el hidrogel), al igual que en los métodos de microextracción recogidos en la Tabla 4.8, en los que se emplean volúmenes del orden de microlitros (9, 85, 87) o cantidades de sorbente del orden de mg (86).

Tabla 4.8. Comparativa del método optimizado pH-HGME-HPLC-FD con otros métodos de microextracción de la bibliografía que también utilizan HPLC-FD como sistema de detección y cuantificación de algunos de los analitos estudiados en este trabajo.

Analitos en común / otros analitos estudiados¹	Matriz / cantidad	Material de extracción² / cantidad	Método de extracción³	Tiempo de extracción	E_R (%)	LOD (ng·L⁻¹)	Ref.
2OHnap, 2OHflu, 2OHphe, Flu, Ft, BaA, NnP	agua / 10 mL	hidrogel / 10 mg en 150 µL de NaOH	pH-HGME	~ 20 min	2.20 – 25.7	1.0 – 90	Este trabajo
BaA / 4 PAHs	agua / 10 mL	MILs / 20 µL	MIL-DLLME	~ 20 min	29.3, 32.0	10	(85)
Flu, Ft, BaA / 11 PAHs	agua / 100 mL	composite magnético / 60 mg	m-µ-SPE	~ 30 min	n.r.	37, 5.0, 0.75	(86)
2OHflu, 2OHphe / 2 OH-PAHs	orina / 10 mL	surfactante basado en IL / 20 µL	DLLME	~ 15 min	18.6, 26.7	1.0	(9)
NnP / 3 fenoles	agua / 10 mL	IL / 65 µL	DLLME	~ 30 min	n.r.	350	(87)]

n.r.: no reportado

¹ Abreviaturas: PAHs para hidrocarburos aromáticos policíclicos, OH-PAHs para hidrocarburos aromáticos policíclicos monohidroxilados.

² Abreviaturas: MILs para líquidos iónicos magnéticos, IL para líquido iónico.

³ Abreviaturas: pH-HGME para microextracción con hidrogeles sensibles al pH, MIL-DLLME para microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos magnéticos, m-µ-SPE para extracción en fase sólida magnética, DLLME para microextracción líquido-líquido dispersiva.

Asimismo, es importante señalar que el tiempo aproximado en el que se lleva a cabo el método microextractivo pH-HGME es de unos 20 minutos, similar al encontrado para los otros trabajos recogidos en la Tabla 4.8, en los que se utilizan como máximo tiempos de 30 minutos (86, 87). El método desarrollado presenta las características propias de un método microextractivo (en cuanto a cantidad de material y tiempo de extracción se refiere), y además consigue alcanzar los bajos LODs que se esperan de la combinación de la preconcentración obtenida con el hidrogel y la sensibilidad de la detección fluorescente.

El método pH-HGME-HPLC-FD también se validó en términos de precisión, eficacia extractiva y recuperación relativa. Todos los estudios se llevaron a cabo aplicando el método total a estándares en agua ultrapura a dos niveles de concentración: uno correspondiente a la región de bajas concentraciones del calibrado ($0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y otro a niveles superiores ($2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ambos pertenecientes al rango de calibración de todos los analitos, pero no utilizados para la realización de las curvas de calibrado. Los resultados se recogen en la Tabla 4.9.

La precisión del método pH-HGME-HPLC-FD se evaluó analizando diferentes estándares acuosos en un mismo día (precisión intra-día o repetibilidad) y en diferentes días (precisión inter-día). Los rangos de RSD intra-día ($n = 3$) se pueden observar en la Tabla 4.9. Para el nivel bajo de concentración ($0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) se obtuvieron valores inferiores a 9.9%, mientras que para el nivel alto ($2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) las RSD están comprendidas entre 1.4% y 7.0%. En cuanto a los valores de RSD inter-día ($n = 9$, obtenidos en 3 días no consecutivos), se encuentran entre 7.1% para Flu y 16% para BaA con el nivel de $0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que para la concentración de $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ el valor más alto de RSD es de 11%. En general, la precisión del método es adecuada, ya que todos los valores de RSD son inferiores al 19%, teniendo en cuenta todos los errores que se pueden cometer durante la realización del procedimiento microextractivo. Asimismo, es importante destacar que los valores de RSD obtenidos se consideran aceptables para los niveles de concentración estudiados según la ecuación de Horwitz (88), que establece un RSD máximo de 32% para una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, llegando a admitir un 45.3% para $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabla 4.9. Validación del método total pH-HGME-HPLC-FD en términos de precisión, eficacia extractiva y recuperación relativa usando estándares acuosos a dos niveles de concentración ($0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Analito	Nivel bajo de concentración ($0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)					Nivel alto de concentración ($2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	Rango de RSD intra-día ^a (%)	RSD inter- día ^b (%)	E _F ^c	E _R ^d (%)	RR ^e (%)	Rango de RSD intra-día ^a (%)	RSD inter- día ^b (%)	E _F ^c	E _R ^d (%)	RR ^e (%)
2OHnap	5.4 – 7.5	8.0	1.50	2.20	98.0	3.2 – 7.0	9.2	2.30	3.30	98.1
2OHflu	4.6 – 6.5	7.9	6.60	9.60	88.7	2.9 – 4.8	6.8	9.00	13.1	96.3
2OHphe	4.1 – 5.4	8.3	12.8	18.5	100	1.4 – 5.0	6.5	14.2	20.6	94.6
Flu	2.1 – 6.0	7.1	10.8	15.7	99.2	2.4 – 6.7	5.1	11.8	17.2	96.9
Ft	6.1 – 7.9	10	16.0	23.2	100	4.0 – 5.7	6.4	17.7	25.7	96.0
BaA	9.4 – 9.9	16	13.7	19.9	89.1	1.9 – 5.1	5.3	17.7	25.7	94.7
NnP	4.1 – 8.6	11	12.3	17.9	103	4.2 – 6.1	11	9.90	14.4	86.7

^a Rango de desviaciones estándar relativas intra-día (n = 3)

^b Desviación estándar relativa inter-día (n = 9, 3 días no consecutivos)

^c Factor de enriquecimiento

^d Eficacia extractiva (E_{Fmax} ~69)

^e Recuperación relativa

Asimismo, el factor de enriquecimiento máximo (E_{Fmax}) es de ~ 69 (considerando la ratio entre el volumen inicial de estándar acuoso – conjuntamente con la adición de copolímero en NaOH y ácido clorhídrico – y el volumen de fase rica en hidrogel diluida con ACN – $\sim 150 \mu\text{L}$). Este valor es la máxima preconcentración que se puede alcanzar con el método desarrollado. Los factores de enriquecimiento (E_F), calculados como la ratio entre la concentración obtenida en el extracto utilizando el calibrado del método HPLC-FD y la concentración del estándar acuoso, se recogen en la Tabla 4.9. Para $0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, los E_F están comprendidos entre 1.50 (2OHnap) y 16.0 (Ft), y para $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se encuentran entre 2.30 (2OHnap) y 17.7 (Ft y BaA). En general, la preconcentración de los PAHs es mayor que la de los OH-PAHs. Según los valores de pK_a de los analitos (ver Tabla 3.1), los OH-PAHs y el NnP poseen carácter ácido-base debido a la presencia de grupos hidroxilos en su estructura química. La menor preconcentración de los OH-PAHs frente a los PAHs, que no se ven afectados por el pH de la disolución, podría deberse a que en el medio básico en el que el hidrogel interacciona con los analitos podría provocar que los OH-PAHs se encuentren como alcóxidos, aumentando su solubilidad en medio acuoso. Por otra parte, dentro de cada grupo de analitos se observa la tendencia general de que el factor de enriquecimiento aumenta a medida que se incrementa el peso molecular del analito (ver Tabla 3.1). Así, por ejemplo, entre los OH-PAHs, el 2OHphe es el analito más pesado y presenta mayor E_F que 2OHnap y 2OHflu, cuyos pesos moleculares son menores. Esta característica se relaciona directamente con la hidrofobicidad de los compuestos (según sus valores de $\text{Log } K_{ow}$), que se incrementa a medida que aumenta el peso molecular. Los analitos con mayores valores de $\text{Log } K_{ow}$, en una misma familia, presentan valores de E_F más altos.

Asimismo, los valores de E_F obtenidos para los dos niveles de concentración estudiados en la Tabla 4.9 se pueden comparar con los E_F obtenidos a partir de la ratio entre las pendientes del calibrado del método total (Tabla 4.7) y las pendientes del calibrado cromatográfico (Tabla 4.2). Estos factores de enriquecimiento permiten evaluar la preconcentración obtenida con el método pH-HGME-HPLC-FD sin tener en consideración el nivel de concentración del estándar acuoso al que se le aplica el método. Los valores de E_F obtenidos de esta manera son los siguientes: 2.60 (2OHnap), 9.90 (2OHflu), 15.8 (2OHphe), 12.7 (Flu), 19.3 (Ft), 19.7 (BaA) y 11.3 (NnP). Se mantiene la tendencia observada de mayor preconcentración para PAHs que para OH-PAHs y un

mayor enriquecimiento, dentro de cada familia de analitos, para aquellos con mayor Log K_{ow} y por tanto más hidrofóbicos.

En la Figura 4.9, se puede observar la preconcentración obtenida con el método de microextracción optimizado. Para ello, se ha superpuesto el cromatograma correspondiente a la inyección de un estándar de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el HPLC-FD con el cromatograma resultante de la inyección de un extracto de fase rica en hidrogel tras someter un estándar acuoso de $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ al método analítico total pH-HGME-HPLC-FD. A pesar de que la concentración del estándar acuoso es 15 veces menor que la del estándar en ACN, la intensidad de los picos cromatográficos es similar, lo que pone de manifiesto la preconcentración conseguida utilizando el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico.

Teniendo en cuenta los factores de enriquecimiento obtenidos para los dos niveles de concentración utilizados en la validación, se calcularon las eficacias extractivas (E_R , %) aplicando la Ecuación 5.

$$E_R = \frac{E_F}{E_{Fmax}} \cdot 100$$

Ecuación 5

Los valores de E_R se recogen en la Tabla 4.9 y están comprendidos entre 2.20% (2OHnap) y 23.2% (Ft) para el nivel de concentración de $0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y entre 3.30% (2OHnap) y 25.7% (Ft y BaA) para la concentración de $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. El método presenta en general mayores eficacias extractivas a altas concentraciones, lo cual es una tónica habitual en estas metodologías. Es importante resaltar que, en microextracción analítica, no es habitual alcanzar valores de 100% en la eficacia extractiva, y, de hecho, valores inferiores al 20% son admisibles siempre y cuando el método resultante sea preciso y posea una adecuada sensibilidad, de modo que el factor de preconcentración compense la inexistencia de una extracción cuantitativa (89). En la Tabla 4.8 se observa precisamente que esta tendencia de valores de E_R próximos al 20% también se cumple en otros trabajos en los que se han determinado algunos de los analitos de este estudio por HPLC-FD. Así el máximo valor de E_R recogido en la Tabla 4.8 es de un 32.0% (85).

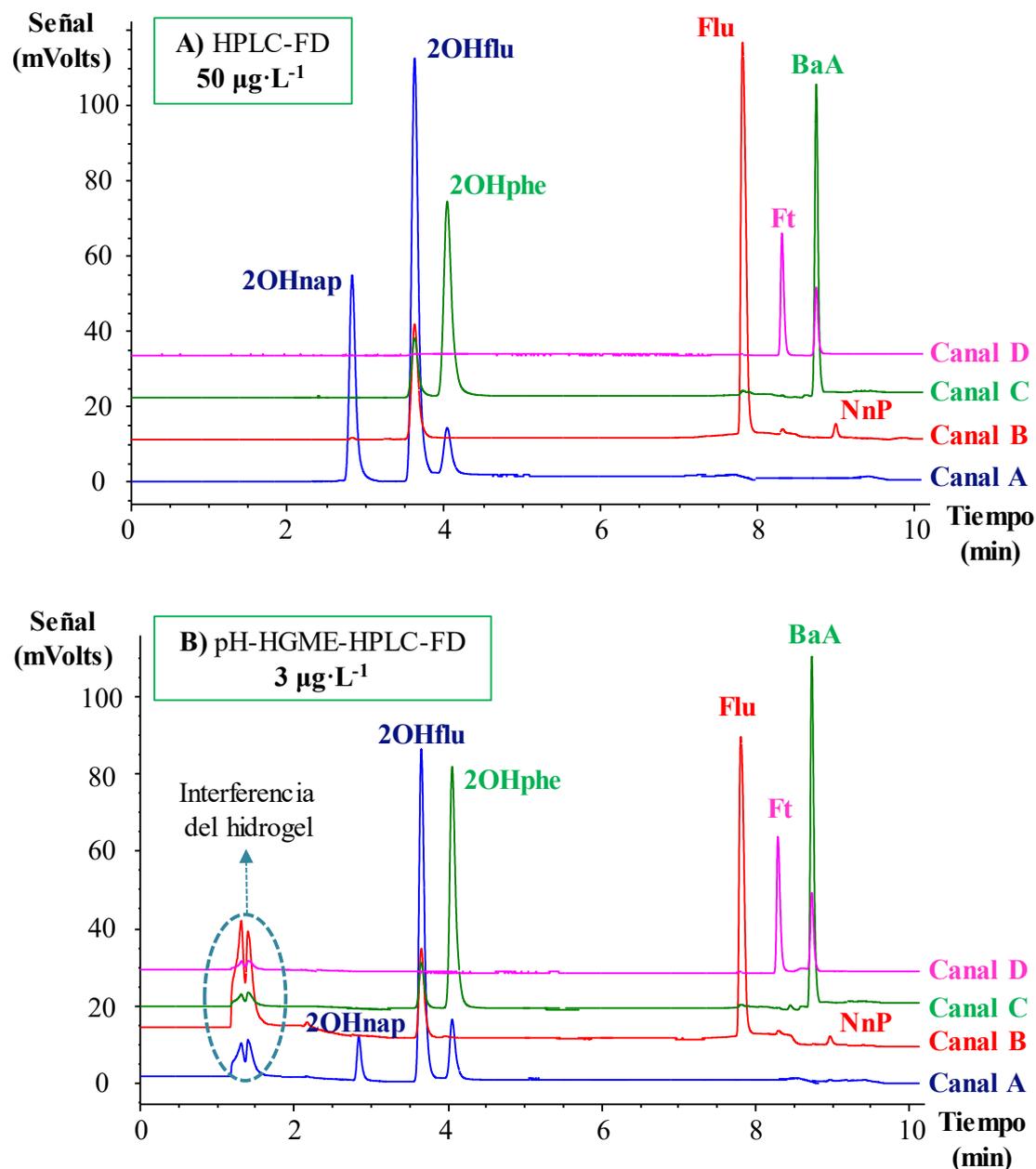


Figura 4.9. Cromatogramas representativos de: (A) la inyección en el HPLC-FD de un estándar en ACN de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ conteniendo todos los analitos y (B) la inyección en el HPLC-FD de la fase rica en hidrogel disuelta en ACN tras someter un estándar acuoso de $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ al método microextractivo pH-HGME. Para estas representaciones se ha realizado un desplazamiento del 10% entre las señales de los distintos canales de fluorescencia, de cara a facilitar su visualización.

Finalmente, se obtuvieron las recuperaciones relativas (RR, %), como medida de comprobación del método de microextracción, pues estos valores deben estar en torno al 100%. Los valores de RR, recogidos en la Tabla 4.9, oscilan entre 88.7% y 103% para el nivel de concentración de $0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y están comprendidos entre 86.7% y 98.1% para la concentración de $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Todos los analitos presentan valores adecuados de RR.

4.5. Análisis de muestras de agua

El método desarrollado pH-HGME-HPLC-FD se aplicó en el análisis de dos muestras de agua potable provenientes de diferentes zonas geográficas de la isla de Tenerife (agua potable 1, muestreada en el laboratorio; y agua potable 2, recogida en el norte de la isla). Ninguno de los analitos fue detectado en las muestras analizadas.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la matriz en el método pH-HGME-HPLC-FD, se analizó cada muestra por triplicado, enriqueciéndolas previamente con el nivel de concentración de los analitos de $0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (el nivel más bajo). Los resultados se recogen en la Tabla 4.10. Los estudios de precisión del método pH-HGME-HPLC-FD en agua potable condujeron a valores de RSD que oscilan entre 0.3% (Ft) y 8.0% (2OHnap) para el agua potable 1, y están comprendidos entre 2.1% (2OHflu) y 8.7% (Ft) para el agua potable 2. Como se puede observar, en todos los casos los valores de RSD fueron inferiores al 10%, verificando así la adecuada precisión del método en esta matriz.

En cuanto a los factores de enriquecimiento, para algunos analitos se obtuvieron valores mayores que los obtenidos con el método en agua ultrapura (ver Tabla 4.9), como el 2OHflu en el agua potable 1 ($E_F = 7.79$, frente a $E_F = 6.60$ en agua ultrapura). Este analito presentó en el agua potable 2, no obstante, la misma preconcentración que en agua ultrapura ($E_F = 6.60$). Para otros analitos se obtuvo una menor preconcentración en el agua potable, como el 2OHphe ($E_F = 11.6$ para el agua potable 1 y $E_F = 10.7$ para el agua potable 2, frente a un valor de E_F de 12.8 en agua ultrapura). Cabe destacar que no fue posible calcular el valor de E_F para el 2OHnap en la muestra de agua potable 1, dado que la señal obtenida da lugar a una concentración inferior al LOD del método cromatográfico HPLC-FD.

Tabla 4.10. Aplicación del método pH-HGME-HPLC-FD para el análisis de diferentes muestras de agua potable y evaluación del efecto matriz al nivel de concentración de $0.60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Analito	Agua potable 1					Agua potable 2				
	RSD ^a (%)	E _F ^b	E _R ^c (%)	Evaluación del efecto matriz		RSD ^a (%)	E _F ^b	E _R ^c (%)	Evaluación del efecto matriz	
				RR ^d (%)	t _{cal} ^e				RR ^d (%)	t _{cal} ^e
2OHnap	-*	-*	-*	38.6*	26.70*	4.4	1.40	2.10	95.9	1.98
2OHflu	6.1	7.79	11.3	100	0.06	2.1	6.60	9.60	88.6	11.88
2OHphe	5.5	11.6	16.8	92.8	2.85	6.1	10.7	15.5	87.1	4.98
Flu	3.7	9.52	13.8	88.9	6.58	3.4	8.50	12.4	81.1	13.31
Ft	0.3	14.9	21.5	94.4	41.90	8.7	13.0	18.9	85.0	4.18
BaA	1.5	14.7	21.3	94.0	8.42	7.2	12.6	18.3	83.7	5.39
NnP	5.5	11.5	16.7	95.8	0.99	7.2	13.2	19.2	111	1.62

* Analito no detectado utilizando el calibrado del método HPLC-FD (concentración inferior al LOD del método HPLC-FD), y con una baja recuperación si se utiliza el calibrado del método pH-HGME-HPLC-FD para su cuantificación

^a Desviación estándar relativa (n = 3)

^b Factor de enriquecimiento

^c Eficacia extractiva (E_{Fmax} ~69)

^d Recuperación relativa

^e Valores de t de Student calculados para las recuperaciones relativas. t_{crit} para un nivel de significación de 0.05 y 2 grados de libertad es 4.30

Las diferencias entre la preconcentración observada con el método pH-HGME-HPLC-FD en aguas potables y la obtenida en la validación en agua ultrapura, distinta para cada analito, sugirieron la realización de un test estadístico para evaluar el posible efecto matriz en agua potable. Para ello, se calcularon las recuperaciones relativas para ambas muestras y se realizó un test t de Student con el objetivo de comprobar si los valores de RR difieren significativamente de la extracción con estándares en agua ultrapura (RR = 100%). Los resultados se recogen en la Tabla 4.10. Los valores de RR estuvieron comprendidos entre 88.9% (Flu) y 100% (2OHflu) para el agua potable 1 (exceptuando el 2OHnap, que presentó una baja recuperación, del 38%); y oscilaron entre 81.1% (Flu) y 111% (NnP) para el agua potable 2. El valor de t_{crit} fue de 4.30 para un nivel de significación del 0.05% y 2 grados de libertad ($n = 3$ réplicas por cada muestra). Los valores de t_{cal} se recogen en la Tabla 4.10. Asumiendo una hipótesis nula de que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de RR obtenidos y el valor de referencia de 100%, para todos los analitos cuya t_{cal} fue mayor que la t_{crit} se rechazó dicha hipótesis, verificando la existencia de efecto matriz en estos casos. Así, se puede observar que en la muestra de agua potable 1 existe efecto matriz para 2OHnap, Flu, Ft y BaA, mientras que en la muestra de agua potable 2 el efecto matriz lo presentan 2OHflu, 2OHphe, Flu y BaA. Por tanto, en general el método pH-HGME-HPLC-FD puede ser aplicado para análisis de muestras de agua potable, pues presenta buena precisión y adecuadas eficacias extractivas, pero es recomendable llevar a cabo una calibración en la matriz o el uso de adiciones estándar.

CAPÍTULO 5.- CONCLUSIONES

Como conclusión general del presente trabajo de investigación, se constata que es posible integrar con éxito un hidrogel sensible a los cambios de pH en microextracción analítica. El método desarrollado resulta ser simple y rápido e incorpora las propiedades de los hidrogeles en procedimientos analíticos de preparación de muestras. La excelente capacidad del hidrogel de responder a estímulos externos permite incorporarlo en una estrategia de preconcentración dirigida por un simple cambio en el pH del medio, siendo necesaria solo una pequeña cantidad de copolímero para generar *in situ* el material de extracción.

Como conclusiones parciales del presente trabajo, cabe resaltar las siguientes:

- Se ha desarrollado y validado con éxito un método cromatográfico HPLC-FD para la identificación y separación de 7 contaminantes orgánicos de diferente naturaleza: 3 PAHs, 3 OH-PAHs y NnP, en cortos tiempos y con adecuada resolución cromatográfica y sensibilidad analítica.
- Se ha sintetizado con éxito y caracterizado adecuadamente el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico.
- Del estudio de solubilidad del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico en medio acuoso a diferentes valores de pH se han elucidado los cambios estructurales, permitiendo comprobar la generación *in situ* de un hidrogel soluble por adición de NaOH y su posterior insolubilización al añadir HCl.
- Se ha optimizado un nuevo método de microextracción con el hidrogel sensible a los cambios de pH (generado a partir del copolímero de poliestireno-anhídrido maleico), utilizando adecuadamente un diseño experimental por matriz de Doehlert de dos factores. Las variables que presentaron mayor influencia en el método microextractivo (concentración de ácido clorhídrico para insolubilizar el hidrogel y cantidad inicial de copolímero) fueron las incluidas en tal diseño.
- Se ha validado convenientemente el método total pH-HGME-HPLC-FD con el hidrogel basado en el copolímero de poliestireno-anhídrido maleico. El método desarrollado demuestra adecuada precisión intermedia y presenta una elevada sensibilidad, con bajos LODs (del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), además de requerir bajos tiempos

de extracción, resultando en conjunto un procedimiento sencillo. Asimismo, permite obtener preconcentraciones adecuadas, con valores de eficacias extractivas próximos a los comúnmente aceptados para un método de microextracción.

- El método pH-HGME-HPLC-FD se ha aplicado al análisis de muestras de agua potable, constatándose un efecto matriz para alguno de los analitos estudiados (concretamente 2OHnap, Flu, Ft y BaA en el agua potable 1 y 2OHflu, 2OHphe, Flu y BaA en el agua potable 2).

En futuros trabajos se pretende profundizar en el estudio del mecanismo de interacción entre los analitos y el hidrogel para maximizar las eficacias extractivas. Asimismo, es de interés incorporar en métodos de microextracción otro tipo de hidrogeles sensibles a cambios de pH, de temperatura o incluso con doble respuesta pH/temperatura. Los hidrogeles demuestran poseer versatilidad para la microextracción analítica, dada la facilidad con la que se puede modular el estímulo en el medio que posibilita la preconcentración de los analitos en la fase rica en hidrogel, permitiendo diseñar metodologías rápidas, sencillas, selectivas y sensibles.

GLOSARIO

$^1\text{H-RMN}$	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón
2OHflu	2-hidroxifluoreno
2OHnap	2-hidroxinaftaleno
2OHphe	2-hidroxifenantreno
ACN	Acetonitrilo
AIBN	Azobisisobutironitrilo
BaA	Benzo(a)antraceno
CMC	Concentración micelar crítica
CNTs	Nanotubos de carbono
CST	Temperatura crítica de disolución
DESS	Disolventes de punto eutéctico ultra-bajo
DI-SPME	Microextracción en fase sólida en la modalidad de inmersión directa
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
D-μ-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva miniaturizada
E_F	Factor de enriquecimiento
$E_{F\text{max}}$	Factor de enriquecimiento máximo
E_R	Eficacia de extracción
FD	Detección fluorescente
Flu	Fluoreno
Ft	Fluoranteno

GAC	Química analítica verde
HBA	Aceptor de enlaces de hidrógeno
HBD	Dador de enlaces de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS-SPME	Microextracción en fase sólida de espacio en cabeza
IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos
ILs	Líquidos iónicos
LC	Cromatografía líquida
LCST	Temperatura crítica de disolución baja
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción en fase líquida
m-D-μ-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva magnética miniaturizada
MIL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos magnéticos
MILs	Líquidos iónicos magnéticos
MIPs	Polímeros de impronta molecular
MOFs	Redes metal-orgánicas
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NADESs	Disolventes de punto eutéctico ultra-bajo naturales
NnP	4-nonilfenol
OH-PAHs	Hydrocarburos aromáticos policíclicos monohidroxilados
PAHs	Hydrocarburos aromáticos policíclicos
pH-HGME	Microextracción con hidrogeles sensibles a los cambios de pH

PILs	Polímeros de líquidos iónicos
PTFE	Politetrafluoroetileno
R	Coefficiente de correlación
R²	Coefficiente de determinación
RR	Recuperación relativa
RSD	Desviación estándar relativa
S/N	Relación señal/ruido
SPME	Microextracción en fase sólida
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
S_{y/x}	Desviación estándar de los residuos
t_{cal}	t de <i>Student</i> calculada
t_{crit}	t de <i>Student</i> crítica
UCST	Temperatura crítica de disolución alta
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
μ-SPE	Extracción en fase sólida miniaturizada

REFERENCIAS

- (1) Havlikova, M.; Cabala, R.; Pacakova, V.; Bursova, M.; Bosakova, Z. *J. Sep. Sci.* **2019**, *42*, 273–284.
- (2) Fumes, B. H.; Silva, M. R.; Andrade, F. N.; Nazario, C. E. D.; Lanças, F. M. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 9–25.
- (3) Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2013**, *50*, 78–84.
- (4) Armenta, S.; Garrigues, S.; Esteve-Turrillas, F. A.; de la Guardia, M. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *in press*.
- (5) Pacheco-Fernández, I.; Pino, V. *Green Solvents in Analytical Chemistry. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry.* 2019, pp 42–50.
- (6) Yavir, K.; Marcinkowski, Ł.; Marcinkowska, R.; Namieśnik, J.; Kloskowski, A. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1054*, 1–16.
- (7) Płotka-Wasyłka, J.; Rutkowska, M.; Owczarek, K.; Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2017**, *91*, 12–25.
- (8) Pacheco-Fernández, I.; Pino, V.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1559*, 102–111.
- (9) Pacheco-Fernández, I.; Pino, V.; Lorenzo-Morales, J.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 4701–4713.
- (10) González-Martín, R.; Pacheco-Fernández, I.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M.; Pino, V. *Talanta* **2019**, *203*, 305–313.
- (11) Trujillo-Rodríguez, M. J.; Nan, H.; Varona, M.; Emaus, M. N.; Souza, I. D.; Anderson, J. L. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 505–531.
- (12) Berthod, A.; Ruiz-Ángel, M. J.; Carda-Broch, S. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1559*, 2–16.
- (13) Mei, M.; Huang, X.; Chen, L. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *112*, 123–134.
- (14) Pacheco-Fernández, I.; Trujillo-Rodríguez, M. J.; Kuroda, K.; Holen, A. L.; Jensen, M. B.; Anderson, J. L. *Talanta* **2019**, *200*, 415–423.
- (15) Souza, I. D.; Hantao, L. W.; Queiroz, M. E. C. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1045*, 108–116.
- (16) Sajid, M. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *113*, 210–223.

- (17) Trujillo-Rodríguez, M. J.; Anderson, J. L. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1588*, 8–16.
- (18) Fiorentini, E. F.; Canizo, B. V.; Wuilloud, R. G. *Talanta* **2019**, *198*, 146–153.
- (19) Pacheco-Fernández, I.; González-Hernández, P.; Pino, V.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M. In *Ionic Liquid Devices. Smart Materials Series*; Eftekhari, A., Ed.; Royal Society of Chemistry: Croydon, 2018; pp 53–78.
- (20) Rykowska, I.; Ziemblińska, J.; Nowak, I. *J. Mol. Liq.* **2018**, *259*, 319–339.
- (21) Smith, E. L.; Abbott, A. P.; Ryder, K. S. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11060–11082.
- (22) Cunha, S. C.; Fernandes, J. O. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *105*, 225–239.
- (23) Fernández, M. de los Á.; Boiteux, J.; Espino, M.; Gomez, F. J. V.; Silva, M. F. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1038*, 1–10.
- (24) Clarke, C. J.; Tu, W. C.; Levers, O.; Bröhl, A.; Hallett, J. P. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 747–800.
- (25) Wu, X.; Zhang, X.; Yang, Y.; Liu, Y.; Chen, X. *Food Chem.* **2019**, *291*, 239–244.
- (26) Farajzadeh, M. A.; Sohrabi, H.; Mohebbi, A.; Mogaddam, M. R. A. *J. Sep. Sci.* **2019**, *42*, 1273–1280.
- (27) Xu, P.; Wang, Y.; Chen, J.; Wei, X.; Xu, W.; Ni, R.; Meng, J.; Zhou, Y. *Talanta* **2019**, *202*, 1–10.
- (28) Wang, X.; Liu, B.; Lu, Q.; Qu, Q. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1362*, 1–15.
- (29) González-Sálamo, J.; Socas-Rodríguez, B.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 203–220.
- (30) Nouri, N.; Khorram, P.; Sereshti, H. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 232.
- (31) Chen, D.; Xu, H. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 300.
- (32) Golzari Aqda, T.; Behkami, S.; Raoofi, M.; Bagheri, H. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1591*, 7–14.
- (33) de Toffoli, A. L.; Maciel, E. V. S.; Fumes, B. H.; Lanças, F. M. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 288–302.
- (34) Ali, M. E. A. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, *570*, 107–116.
- (35) Madej, K.; Jonda, A.; Borcuch, A.; Piekoszewski, W.; Chmielarz, L.; Gil, B. *Microchem. J.* **2019**, *147*, 962–971.
- (36) Pei, M.; Shi, X. L.; Wu, J.; Huang, X. *Talanta* **2019**, *191*, 257–264.
- (37) Azzouz, A.; Kailasa, S. K.; Lee, S. S.; J. Rascón, A.; Ballesteros, E.; Zhang, M.; Kim, K. H. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *108*, 347–369.

-
- (38) Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1357*, 110–146.
- (39) Fu, L.; Zhou, H.; Miao, E.; Lu, S.; Jing, S.; Hu, Y.; Wei, L.; Zhan, J.; Wu, M. *Food Chem.* **2019**, *289*, 701–707.
- (40) Abbasi, S.; Haeri, S. A. *J. Iran. Chem. Soc.* **2018**, *15*, 2395–2400.
- (41) Pacheco-Fernández, I.; Gutiérrez-Serpa, A.; Rocío-Bautista, P.; Pino, V. In *Solid-Phase Microextraction: Advances in Research and Applications*; Verreau, Warrane; Baril, G., Ed.; Nova Science Publisher, Inc.: New York, 2017; pp 147–168.
- (42) Chen, L.; Wang, X.; Lu, W.; Wu, X.; Li, J. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2137–2211.
- (43) Zhou, T.; Ding, L.; Che, G.; Jiang, W.; Sang, L. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *114*, 11–28.
- (44) Lu, Y. C.; Guo, M. H.; Mao, J. H.; Xiong, X. H.; Liu, Y. J.; Li, Y. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *177*, 66–76.
- (45) Li, Z.; Wang, J.; Chen, X.; Hu, S.; Gong, T.; Xian, Q. *Food Chem.* **2019**, *292*, 267–274.
- (46) Zakerian, R.; Bahar, S. *J. Iran. Chem. Soc.* **2019**, *16*, 741–745.
- (47) Alnaimat, A. S.; Barciela-Alonso, M. C.; Bermejo-Barrera, P. *Microchem. J.* **2019**, *147*, 598–604.
- (48) Wang, Y.; Rui, M.; Lu, G. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 180–194.
- (49) Pacheco-Fernández, I.; González-Hernández, P.; Pasán, J.; Ayala, J. H.; Pino, V. In *Handbook of Smart Materials in Analytical Chemistry*; de la Guardia, Miguel; Esteve-Turrillas, F. A., Ed.; Wiley: Nueva York, 2019; pp 463–502.
- (50) Liu, M.; Liu, J.; Guo, C.; Li, Y. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1584*, 57–63.
- (51) Gao, G.; Xing, Y.; Liu, T.; Wang, J.; Hou, X. *Microchem. J.* **2019**, *146*, 126–133.
- (52) Tan, S. C.; Lee, H. K. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 165.
- (53) González-Hernández, P.; Lago, A. B.; Pasán, J.; Ruiz-Pérez, C.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M.; Pino, V. *Molecules* **2019**, *24*, 690.
- (54) Rocío-Bautista, P.; Pino, V.; Pasán, J.; López-Hernández, I.; Ayala, J. H.; Ruiz-Pérez, C.; Afonso, A. M. *Talanta* **2018**, *179*, 775–783.
- (55) Taima-Mancera, I.; Rocío-Bautista, P.; Pasán, J.; Ayala, J. H.; Ruiz-Pérez, C.; Afonso, A. M.; Lago, A. B.; Pino, V. *Molecules* **2018**, *23*, 2869.

- (56) Rocío-Bautista, P.; Pino, V.; Ayala, J. H.; Ruiz-Pérez, C.; Vallcorba, O.; Afonso, A. M.; Pasán, J. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 31304–31310.
- (57) Faraji, M.; Yamini, Y.; Gholami, M. *Chromatographia* **2019**, *in press*.
- (58) Sajid, M.; Khaled Nazal, M.; Rutkowska, M.; Szczepańska, N.; Namieśnik, J.; Płotka-Wasyłka, J. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2019**, *49*, 271–288.
- (59) Abujaber, F.; Corps Ricardo, A. I.; Ríos, Á.; Guzmán Bernardo, F. J.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *165*, 141–146.
- (60) Brijitta, J.; Schurtenberger, P. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *40*, 87–103.
- (61) Liang, R.; Wang, L.; Yu, H.; Khan, A.; Ul Amin, B.; Khan, R. U. *Eur. Polym. J.* **2019**, *114*, 380–396.
- (62) Yan, Q.; Liu, L.; Wang, T.; Wang, H. *Colloid Polym. Sci.* **2019**, *297*, 705–717.
- (63) Khan, H.; Chaudhary, J. P.; Meena, R. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *124*, 1220–1229.
- (64) Jiao, J.; Huang, J.; Zhang, Z. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 1–9.
- (65) Chatterjee, S.; Hui, P. C. L.; Kan, C. wai. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*.
- (66) Hapiot, F.; Menuel, S.; Monflier, E. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1006–1010.
- (67) Häring, M.; Tautz, M.; Alegre-Requena, J. V.; Saldías, C.; Díaz Díaz, D. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 3293–3306.
- (68) Sampaio, N. M. F. M.; Castilhos, N. D. B.; Da Silva, B. C.; Riegel-Vidotti, I. C.; Silva, B. J. G. *Molecules* **2019**, *24*, 40.
- (69) Öztürk Er, E.; Maltepe, E.; Bakirdere, S. *Microchem. J.* **2018**, *143*, 393–399.
- (70) Yu, H.; Wang, Z.; Wu, R.; Chen, X.; Chan, T. W. D. *J. Chromatogr. A* **2019**, *in press*.
- (71) Chen, X.; Guo, Z.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xu, Y.; Liu, J.; Li, Z.; Zhao, J. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1592*, 183–187.
- (72) Buwalda, S. J.; Boere, K. W. M.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Vermonden, T.; Hennink, W. E. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 254–273.
- (73) Mah, E.; Ghosh, R. *Processes* **2013**, *1*, 238–262.
- (74) Longo, G. S.; Pérez-Chávez, N. A.; Szleifer, I. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *41*, 27–39.
- (75) Lima, D. S.; Tenório-Neto, E. T.; Lima-Tenório, M. K.; Guilherme, M. R.; Scariot, D. B.; Nakamura, C. V.; Muniz, E. C.; Rubira, A. F. *J. Mol. Liq.* **2018**, *262*, 29–

- 36.
- (76) Bahram, M.; Nurallahzadeh, N.; Mohseni, N. *J. Iran. Chem. Soc.* **2015**, *12*, 1781–1787.
- (77) Bahram, M.; Keshvari, F.; Najafi-Moghaddam, P. *Talanta* **2011**, *85*, 891–896.
- (78) Henry, S. M.; El-Sayed, M. E. H.; Pirie, C. M.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2407–2414.
- (79) Duan, X.; Xiao, J.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Mao, S.; Li, Y. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 4961–4972.
- (80) Nzila, A. *Environ. Pollut.* **2018**, *239*, 788–802.
- (81) Abbas, I.; Badran, G.; Verdin, A.; Ledoux, F.; Roumié, M.; Courcot, D.; Garçon, G. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *16*, 439–475.
- (82) Acir, I. H.; Guenther, K. *Sci. Total Environ.* **2018**, *635*, 1530–1546.
- (83) Miller, James N., Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; Miller, James N., Miller, J. C., Ed.; Pearson Education Limited: Harlow, 2010.
- (84) Ferreira, S. L. C.; Dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosquesendra, J. M. *Talanta* **2004**, *63*, 1061–1067.
- (85) Trujillo-Rodríguez, M. J.; Nacham, O.; Clark, K. D.; Pino, V.; Anderson, J. L.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *934*, 106–113.
- (86) Yang, X.; Yin, Y.; Zong, Y.; Wan, T.; Liao, X. *Microchem. J.* **2019**, *145*, 26–34.
- (87) Zhou, Q.; Gao, Y.; Xie, G. *Talanta* **2011**, *85*, 1598–1602.
- (88) Taverniers, I.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 535–552.
- (89) López-Darias, J.; Germán-Hernández, M.; Pino, V.; Afonso, A. M. *Talanta* **2010**, *80*, 1611–1618.

