

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

Grado en Ciencias Ambientales



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

“SÍNTESI DE POLÍMERS AMB I SENSE EMPREMTA MOLECULAR PER A L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA DE L'HERBICIDA DICLOFOP-METIL”

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a:
Natalia Prima Margiotta

Tutor/a:
Sagrario Torres Cartas
Susana Meseguer Lloret

GANDIA, 2019

RESUM

L'anàlisi de contaminants ambientals en aigua és complex a causa de la baixa concentració dels contaminants i la gran varietat de compostos presents en les mostres. Per aquests motius, en l'anàlisi d'herbicides en mostres d'aigua es duen a terme diferents etapes prèvies a l'anàlisi, que permeten la preconcentració dels contaminants i la neteja de la mostra. Un dels procediments més àmpliament utilitzat és l'extracció en fase sòlida. L'obtenció de nous sorbents per a l'extracció selectiva de compostos d'interès està en continu desenvolupament.

Els polímers d'empremta molecular (MIP) són polímers sintètics amb cavitats específiques capaços de reconèixer i interaccionar de forma selectiva amb el compost d'interès (compost plantilla). La síntesi del MIP es du a terme en presència de una molècula plantilla, que posteriorment es llava deixant la seua empremta al polímer. Així, aquests polímers poden utilitzar-se per a l'extracció selectiva de la molècula plantilla i altres molècules amb estructures similars.

En aquest projecte s'han sintetitzat polímers MIP emprant com a molècula plantilla l'herbicide diclofop-metil, i s'han emprat dos monòmers diferents (àcid metacrílic o 4-vinilpiridina). Els polímers sintetitzats s'han empaquetat en xeringues i s'han emprat en l'extracció en fase sòlida de dissolucions aquoses d'un grup d'herbicides de la família dels ariloxifenoxipropiònics.

Paraules clau: Polímer d'empremta molecular (MIP); diclofop-metil; extracció en fase sòlida; preconcentració; cromatografia.

ABSTRACT

Analysis of environmental pollutants in water is complex due to the low concentration of contaminants and the great variety of compounds present in the real samples. For these reasons, in the analysis of herbicides in water samples, preconcentration of compounds and sample cleaning are generally carried out. One of the procedures most widely used is solid phase extraction (SPE), and the synthesis of new sorbents for the selective extraction of environmental compounds is in continuous development.

Molecularly imprinted polymers (MIP) are synthetic polymers with specific cavities, which are capable of recognizing and interacting selectively with the compound of interest (template). The synthesis of a MIP is carried out in the presence of the template, which is washed after the synthesis, leaving its print into the polymer. Thus, these polymers can be used for the selective extraction of the template employed in the synthesis and/or other molecules with similar structure.

In this project, several MIPs have been synthesized by using diclofop-methyl as template, and two different monomers, methacrylic acid or 4-vinylpyridine. The synthesized polymers have been packaged into syringes and have been used in the solid phase extraction of aqueous solutions of both diclofop-methyl and a group of five aryloxyphenoxypropionic herbicides.

Keywords: Molecular Imprinted Polymer (MIP); Diclofop-methyl; Solid phase extraction; Preconcentration; Chromatography

INDEX d'ABREVIATURES

ACN: acetonitril

AcH: àcid acètic

AIBN: azo-bis-isobutironitril

CG: cromatografia de gasos

CL: cromatografia líquida

EDMA: etilenglicol dimetacrilat

HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució

MAA: àcid metacrílic

MeOH: metanol

MIP: polímer d'empremta molecular

NIP: polímer sense empremta molecular

SPE: extracció en fase sòlida

4-VP: 4-vinilpiridina

Contingut

1.	Introducció	1
1.1.	Herbicides ariloxifenoxipropiònics	1
1.1.1.	Diclofop-metil.....	1
1.2.	Cromatografia.....	3
1.2.1.	Cromatografia líquida d'alta resolució	4
1.3.	Tècniques de preparació de mostra.....	6
1.3.1.	Extracció en fase sòlida.....	7
1.4.	Sorbents polimèrics	11
1.4.1.	Síntesi de polímers de metacrilat.....	11
1.4.2.	Polímers d'empremta molecular	13
2.	Context	16
3.	Objectius.....	16
4.	Reactius, material i instrumentació	17
5.	Procediment experimental	19
5.1.	Síntesi dels polímers	19
5.1.1.	Polímers sintetitzats amb el monòmer àcid metacrílic.....	20
5.1.2.	Polímers sintetitzats amb el monòmer 4-vinilpiridina.....	21
5.2.	Neteja dels polímers	21
5.2.1.	Neteja del NIP	21
5.2.2.	Neteja del MIP	22
5.3.	Preparació dels cartutxos d'extracció en fase sòlida.....	24
5.4.	Procés d'extracció en fase sòlida.....	24
5.5.	Anàlisi cromatogràfic	24
5.5.1.	Determinació individual del diclofop-metil	25
5.5.2.	Determinació d'una mescla d'ariloxifenoxipropiònics	26
6.	Resultats i discussió	28
6.1.	Estudi preliminar: selecció de l'eluent d'SPE	28
6.2.	Influència de l'etapa de neteja d'SPE.....	29
6.2.1.	Dissolvent de neteja: diclorometà	29
6.2.2.	Dissolvent de neteja: dissolucions aquoses de diferent pH.....	29
6.2.3.	Dissolvent de neteja: mescles metanol:aigua	30
6.2.4.	Dissolvent de neteja: mescles acetonitril:aigua.....	31
6.3.	Comparació del comportament NIP-MIP en l'extracció del diclofop-metil.....	32
6.3.1.	Comparació amb els polímers sintetitzats amb àcid metacrílic.....	32

6.3.2.	Comparació amb els polímers sintetitzats amb 4-vinilpiridina	33
6.4.	Estudi de la influència del temps de contacte plantilla-monòmer	33
6.4.1.	Influència amb polímers sintetitzats amb àcid metacrílic.....	34
6.4.2.	Influència amb polímers sintetitzats amb 4-vinilpiridina.....	34
6.5.	Extracció d'una mescla d'herbicides amb els sorbents de 4-VP.....	35
6.5.1.	Estudi de l'extracció d'una mescla patró de 5 herbicides	36
6.5.2.	Estudi de l'extracció de la mescla d'herbicides en mostres reals	36
7.	Conclusions	38
8.	Bibliografia.....	40

1. Introducció

En l'anàlisi de contaminants ambientals, en molts casos, es necessita determinar compostos que estan en concentracions molt baixes i en presència de molts altres compostos. Aquest és el cas, per exemple, de la determinació de plaguicides en mostres d'aigua i altres matrius.

Les tècniques d'anàlisi més comunes amb capacitat per resoldre aquest tipus de mostres són les cromatogràfiques, sent les més habituals la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i la cromatografia de gasos (CG). Per altra banda, en el cas de l'anàlisi de compostos com els plaguicides en aigües, que es troben en aquesta matriu en concentracions molt baixes, es requereixen sovint etapes prèvies de tractament de la mostra, que permeten la seua neteja per a l'eliminació de possibles interferents, i també la concentració dels compostos d'interès. Això s'aconsegueix, per exemple, mitjançant processos d'extracció en cartutxos farcits amb un sorbent (extracció en fase sòlida, SPE). D'entre les distintes tendències en aquest àmbit, una opció és la preparació de nous sorbents a partir de polímers sintetitzats en el laboratori, com són els polímers d'empremta molecular (MIP), polímers en què es creen cavitats específiques on queden temporalment retingudes les molècules objecte d'anàlisi. La preparació d'aquest tipus de sorbents proporciona considerables millores en la resolució i determinació de mostres multicomponents.

En aquest TFG s'ha treballat en la síntesi de nous sorbents polimèrics, amb empremta i sense empremta, que permeten l'extracció quantitativa del plaguicida diclofop-metil i altres similars en dissolucions aquoses, per a la seua posterior determinació mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució.

1.1. Herbicides ariloxifenoxipropiònics

Els herbicides inclosos en aquest estudi pertanyen a la família química dels ariloxifenoxipropiònics i generalment són èsters de cadena curta. Són herbicides anti-graminies que impedeixen la biosíntesi dels lípids per inhibició de l'enzim acetil CoA carboxilasa. En la figura 1 es mostren les estructures de cinc d'aquests herbicides.

D'entre els herbicides assenyalats, aquest treball s'ha centrat principalment en l'herbicida diclofop-metil (Figura 1), del qual es descriuen a continuació les propietats.

1.1.1. Diclofop-metil

El diclofop-metil és un èster metílic del diclofop amb funció d'herbicida post-emergència. La seua fórmula química és $C_{16}H_{14}Cl_2O_4$, la seua solubilitat en aigua és baixa, al voltant de 0.50 mg/L a 20°C, i la seua volatilitat és $2.5 \cdot 10^{-2}$ mPa a 20°C. A més, té un baix risc de lixiviació a les aigües subterrànies (0.16 segons l'índex de potencial de lixiviació GUS) [1].

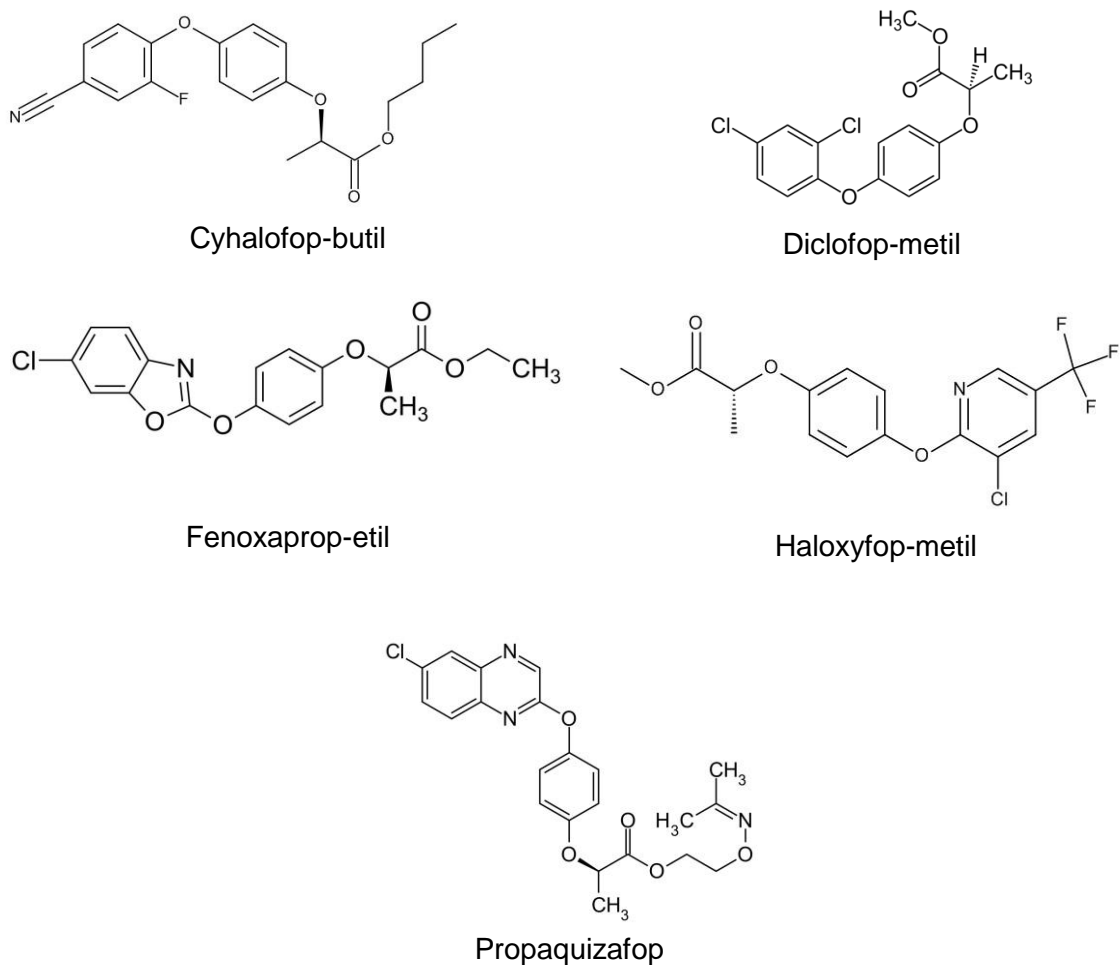


Figura 1. Estructura química de cinc herbicides ariloxifenoxipropiònics (Font: wikipedia).

L'ús del diclofop-metil està aprovat a Grècia, Espanya, Itàlia i Portugal des de l'any 2011 i el venciment de l'aprovació es va establir per al 31/05/2023 [2].

En Espanya hi ha tres empreses que es dediquen a la seua comercialització en forma d'èster metílic de diclofop al 36% (pes/volum) i hi ha quatre marques registrades: *Claro EC*, *SIROFOP EC*, *BENCH* i *Folmentor*.

Aquest herbicida s'utilitza per al tractament de cereals com el blat i l'ordi, i de cultius de fulla ampla com alls, cebes, pèsols, faves, llentilles i remolatxa. Algunes de les plagues controlades són les males herbes, gramínies i algunes dicotiledònies. Tanmateix hi ha exemples de resistència registrada com *Alopecurus myosuroides*, *Avena fàtua*, *Avena sterilis*, *Lolium multiflorum* [3].

En les plantes presenta ràpida absorció per via foliar quan hi ha de 3 a 4 fulles. També actua per via radicular quan al sòl hi ha suficient humitat. A més, destrueix la membrana cel·lular, impedeix la translocació a les arrels de les substàncies assimilades, destrueix els cloroplastos, redueix el contingut de clorofil·la i impedeix la fotosíntesi i la biosíntesi dels lípids per inhibició de l'enzim acetil CoA carboxilasa. Entre els efectes que produeix s'inclouen la descoloració de les fulles, la paralització del creixement, la mort del con vegetatiu i la mort de la planta.

El diclofop-metil no és persistent en sòls, però sí que pot ser-ho en sistemes aquàtics en certes condicions. Respecte a la toxicologia, és moderadament tòxic per a la majoria d'organismes aquàtics, per als cucs de terra i també per als mamífers si és ingerit. En aquests últims, a més de ser cancerigen, pot causar irritació en les vies respiratòries, sensibilitat a la pell i efectes adversos sobre la reproducció i el desenvolupament del fetus en estar exposat. En canvi s'ha trobat que la seua toxicitat és baixa per a les abelles [1].

En la majoria de cultius el nivell màxim de residus de plaguicides permès és de 0.05 mg/kg, però en alguns casos el límit és de 0.1 mg/kg com en alguns vegetals (frescos o congelats) amb arrel i tubercles vegetals, els alls, algunes verdures de *Brassica*, la lletuga, els espinacs i els pèsols sense beines.

Aquest herbicida també pot ser arrastrat per l'aigua en les zones agrícoles. La legislació d'aigües no fixa un límit per al diclofop-metil en concret, però hi ha un límit màxim permès en aigües de consum de 0.1 µg/L per a plaguicides individuals i de 0.5 µg/L per a plaguicides totals [4].

1.2. Cromatografia

La cromatografia és una tècnica analítica que permet la separació dels components d'una mostra. En la cromatografia, la mostra s'injecta en un líquid anomenat *fase mòbil*, i travessa una estructura sòlida porosa, la *fase estacionària*, on se separen els components. Cadascun dels components de la mostra interactua de forma diferent amb les dues fases en funció de les seues característiques fisicoquímiques, el que permet la seua separació en circular a través de la fase estacionària a diferent velocitat. Cada compost químic quan passa per la fase estacionària interacciona amb la superfície quedant-se retintut durant un temps i sortint a un temps de pas característic, el qual es diu temps de retenció [5 - 7].

La classificació dels sistemes cromatogràfics té en compte diversos factors, com l'estat físic de les dues fases, la fase mòbil i la fase estacionària. La fase mòbil pot ser un gas o un líquid; i la fase estacionària pot ser un líquid o un sòlid.

Així, si la fase mòbil és un líquid, la tècnica s'anomena cromatografia líquida (CL) i en el cas de ser un gas, s'anomena cromatografia de gasos (CG). La combinació fase mòbil-fase estacionària pot ser: gas-sòlid, gas-líquid, líquid-líquid i líquid-sòlid.

D'altra banda, es diferencia entre la cromatografia plana, quan el procés de separació es produeix en un pla -cromatografia en paper o de capa fina-, i la cromatografia en columna, quan el procés es produeix en tres dimensions en l'interior d'una columna. En la figura 2 es mostra un exemple de cromatografia líquida en columna: la separació cromatogràfica d'un extracte de fulles verdes, amb tres components (A, B i C), amb una columna de CaCO₃; la fase mòbil és èter de petroli [7].

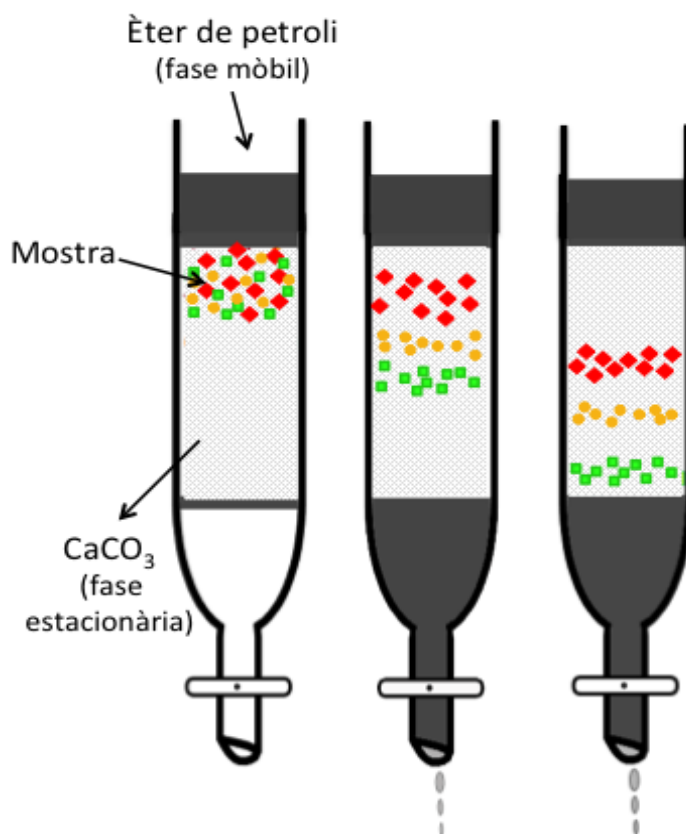


Figura 2: Separació hipotètica de tres components, A (roig), B (groc) i C (verd), d'un extracte de fulles verdes per cromatografia líquida en una columna de CaCO₃ utilitzant com a fase mòbil èter de petroli (Font pròpia).

Per últim, en funció del mecanisme fisicoquímic que té lloc per a la separació cromatogràfica, es pot distingir entre cromatografia d'intercanvi iònic, d'adsorció, d'exclusió, d'interacció iònica, d'afinitat, de quelació i de repartiment, aquesta última és la més àmpliament utilitzada, i l'emprada també en aquest treball.

En la cromatografia de repartiment l'anàlit es distribueix entre la fase mòbil i la fase estacionària. En l'actualitat la fase estacionària en aquest tipus de cromatografia consisteix en un sòlid porós constituït per partícules de diàmetre d'entre 3.5 i 10 µm, resistents, poroses i uniformes, que porten enllaçades químicament cadenes d'un compost orgànic amb determinats grups funcionals. La separació dels components d'una mescla en l'interior de la fase estacionària depèn de la solubilitat relativa de cadascuna de les molècules de solut a l'hora de distribuir-se entre les dos fases, la fase mòbil i la fase estacionària.

1.2.1. Cromatografia líquida d'alta resolució

Per poder arribar a la mateixa eficiència i sensibilitat amb la cromatografia líquida que amb la cromatografia de gasos, va sorgir la cromatografia líquida d'alta resolució, o HPLC per les seues sigles en anglès (*High Performance Liquid Chromatography*). En aquest tipus de cromatografia, les columnes estan formades generalment per

partícules sòlides empaquetades a l'interior d'un tub d'acer. El diàmetre de les partícules de la fase estacionària és d'unes poques micres i per tant és necessari treballar a pressions elevades (fins a 600 bars per a velocitats de flux de la fase mòbil de 0.5 mL/min a 5 mL/min) per forçar el pas del líquid per la columna [6, 7].

En l'actualitat, la HPLC és una de les tècniques més àmpliament utilitzades en l'anàlisi farmacèutica o d'aliments, i en estudis ambientals, forenses i bioquímics. En la indústria farmacèutica s'utilitza per a l'anàlisi de vitamines, esteroides, tetraciclins, i també per a l'anàlisi d'espècies biològicament actives: proteïnes, aminoàcids i àcids nucleics. En l'anàlisi de mostres mediambientals també té un gran paper: s'utilitza per a l'anàlisi de pesticides i herbicides bipiridils com el paraquat i diquat, compostos organofosforats, carbamats, i altres contaminants com aldehids, cetones, fenols i hidrocarburs aromàtics policíclics, entre molts altres [7].

En la figura 3 es mostra un esquema d'un sistema de HPLC amb les diferents parts:

- Dipòsits de dissolvents per a la fase mòbil
- Bomba d'alta pressió, per proporcionar pressió a la fase mòbil, perquè pugui passar a través de la fase estacionària
- Injector, dispositiu per a la introducció de la mostra al sistema
- Columna cromatogràfica, amb la fase estacionària
- Detector, per registrar el senyal en funció del temps
- Sistema informàtic, per registrar i tractar les dades

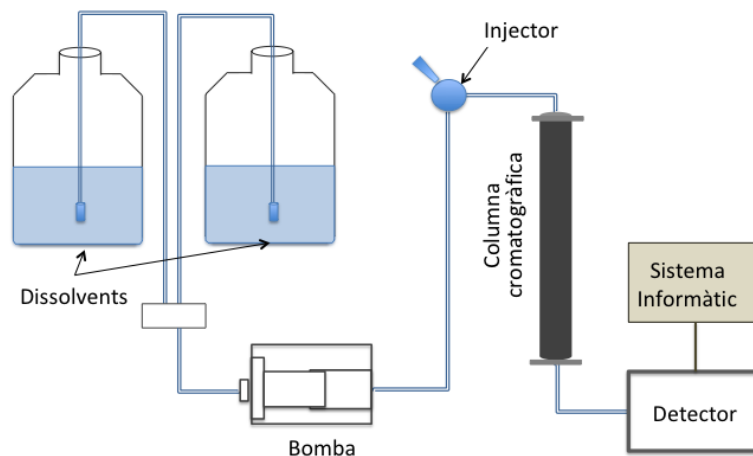


Figura 3: Components bàsics d'un sistema de HPLC (Font: pròpia).

En el nostre cas hem utilitzat la cromatografia líquida en fase inversa, un sistema en el qual la fase estacionària és apolar i la fase mòbil és polar, i la retenció dels components s'incrementa generalment en disminuir-ne la polaritat, de forma que les espècies més polars són eluïts més fàcilment que les apolars perquè tenen poca afinitat per la fase estacionària.

Quant als dissolvents que componen la fase mòbil, els que més s'empren són aigua, dissolucions tampó aquoses i dissolvents orgànics, com per exemple metanol, acetonitril o mesclades. Han de ser espectroscòpicament purs, sense partícules sòlides, i

han d'estar desgasats, ja que la presència d'oxigen provoca la creació de bombolles en les vàlvules de la bomba i en els detectors, interferint de vegades en la detecció i augmentant el soroll de fons.

Els registres obtinguts en HPLC s'anomenen cromatogrames, i són la representació del senyal obtingut en el detector al llarg del temps. En la figura 4 es mostra un exemple de cromatograma obtingut en la separació d'una mescla de sucres amb una fase mòbil aigua-acetonitril [8]. Com s'observa en la figura, cada component de la mescla ve caracteritzat per un temps de retenció (t_r), el temps que tarda a arribar cada compost al detector des de la injecció de la mostra en el cromatògraf. Per a la quantificació dels components s'utilitza l'àrea de cada pic (s'assenyala ombrejada en la figura per a la fructosa), paràmetre que està relacionat amb la concentració dels compostos en la mostra.

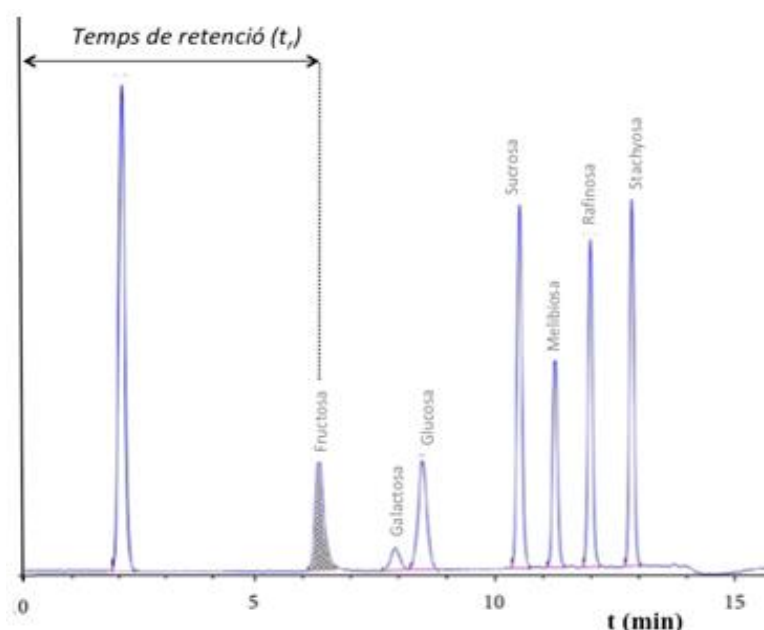


Figura 4. Cromatograma d'una mescla de sucres on es poden veure 7 pics, corresponents als sucres que componen la mostra (Font: modificat de [8]).

1.3. Tècniques de preparació de mostra

La majoria de les mostres que s'han d'analitzar en un laboratori són una mescla complexa de diferents compostos a diferents nivells de concentració, des dels g/L fins als pocs ng/L (ppb), passant pels mg/L (ppm). Si tenim en compte que els compostos d'interès ambiental, com els herbicides, es troben precisament en concentracions molt baixes, és necessària la inclusió d'una etapa de preconcentració dels compostos d'interès abans de l'anàlisi mitjançant el sistema cromatogràfic.

La finalitat d'aquesta etapa és la concentració de l'anàlit o els anàlits en la forma química i concentració adequades per poder-los detectar amb la tècnica analítica seleccionada, a més de l'eliminació dels possibles interferents de la matriu de la mostra.

Aquest tractament de concentració i neteja es fa mitjançant un procediment d'extracció, que permet la separació de l'anàlit de la matriu. Perquè això ocòrriga s'ha de debilitar la interacció entre l'anàlit i la matriu, i augmentar la interacció entre l'anàlit i l'extractant en unes condicions concretes. En funció de la naturalesa de l'extractant i de la mostra podem trobar diferents tècniques d'extracció [9]:

- **Extracció en fase de vapor.** Quan l'anàlit té una pressió de vapor elevada, i per tant, és volàtil i fàcil de separar de la matriu, s'utilitza aquesta propietat per extraure el compost d'interès de la matriu de la mostra. Per exemple, a nivell traça i ultratraça en compostos orgànics volàtils (com els hidrocarburs clorats en diferents tipus d'aigua, etc.).
- **Extracció amb fluids supercrítics.** En aquest cas la mostra és un sòlid i l'extracció de l'anàlit es produeix amb un fluid supercrític, que es troba a una temperatura i pressió per damunt dels seus valors crítics. Un fluid supercrític es pot considerar un híbrid entre gas i líquid i amb propietats singulars per a realitzar l'extracció.

Extracció líquid-líquid. És la transferència d'un anàlit des de la mostra, líquida, a un altre dissolvent, un líquid immiscible amb la mostra.

- **Extracció sòlid-líquid.** Es posa en contacte una mostra sòlida amb un dissolvent líquid, o una mostra líquida amb un sorbent sòlid.
 - o **Dispersió de la mostra en fase sòlida (MSPD):** una quantitat molt xicoteta de la mostra sòlida i una altra paregada de sorbent, també sòlid, es mesclen fins aconseguir una mescla homogènia. La mescla de sòlids s'introdueix en un cartutx d'extracció i els anàlits s'elueixen amb un dissolvent líquid. S'aplica per a determinar principalment pesticides organoclorats i organofosforats, sulfamides, cefalosporines i benzimidazoles.
 - o **Extracció en fase sòlida (SPE).** En aquesta tècnica, la mostra és un líquid que es fa passar a través d'un sòlid empaquetat en una xeringa, on es queden retinguts els components que més afinitat tinguen per a ell. Posteriorment, el compost d'interès s'extraurà del sòlid amb un dissolvent.

Ja que aquest treball se centra en el desenvolupament i ús de materials per a extracció en fase sòlida, s'explicarà amb més detall aquesta tècnica.

1.3.1. Extracció en fase sòlida

En aquest mètode d'extracció es fa passar un volum conegut de la mostra líquida a través d'un sòlid, anomenat sorbent, que es troba dins d'un tub amb forma de xeringa (cartutx), de manera que els compostos amb major afinitat pel sòlid queden retinguts. Posteriorment, es fa passar un volum conegut de dissolvent d'elució, de manera que els compostos passen del sòlid al dissolvent. Aquesta tècnica presenta dos grans avantatges: l'eliminació d'interferències i la preconcentració dels anàlits.

L'**eliminació d'interferències** s'aconsegueix quan els anàlits d'interès queden retinguts en el sorbent, però no la resta de components de la mostra, anomenats interferents. Per altra banda, per poder concentrar els anàlits, és necessari fer passar un volum de mostra molt gran pel sorbent, que pot anar des de 1 mL fins a 1 L. Posteriorment, els anàlits d'interès són eluïts amb un volum xicotet d'un dissolvent adequat; se solen emprar volums de dissolvent d'entre 0.5 i 5 mL per a l'elució dels compostos [9-11].

La SPE és una tècnica àmpliament utilitzada per al tractament de mostres en mètodes d'anàlisi de rutina, ja que és molt versàtil, perquè el sorbent pot ser de naturalesa molt diferent depenent dels compostos que interessen analitzar.

Etapes del procés d'extracció en fase sòlida

Per poder fer l'extracció en fase sòlida s'ha de seguir els següents passos, que també estan descrits de forma esquemàtica en la figura 5 [12-13].

1. Etapa de condicionament del sorbent
2. Etapa de processat de la mostra
3. Etapa de neteja del sorbent
4. Etapa d'assecat del sorbent
5. Etapa d'elució de l'anàlit

Etapa de condicionament del sorbent

S'ha de passar un volum d'un dissolvent o mescla de dissolvents a través del sorbent per a mullar-lo i eliminar l'aire que hi ha al seu interior en el porus. Amb l'addició del dissolvent de condicionat s'activa el sorbent i els grups funcionals en la superfície, de manera que el sòlid interactua amb major eficàcia amb l'anàlit d'interès.

Etapa de processat de la mostra

S'aplica un volum de la mostra que passarà pel sorbent. Només interactuaran alguns compostos, que es quedaran retinguts (els compostos d'interès), mentre que la resta (matriu i possibles interferències) travessaran el sorbent sense quedar-se retinguts. En aquesta etapa és molt important controlar la velocitat de pas de la mostra a través del sorbent per afavorir les interaccions.

Etapa de neteja del sorbent

Es fa passar de nou un dissolvent, o mescla de dissolvents, amb la intenció d'eliminar els interferents que puguin haver quedat retinguts en el sorbent en l'etapa de processat. En aquesta etapa és important la selecció del dissolvent de llavat, perquè només els interferents isquen del cartutx i els anàlits d'interès queden retinguts.

Etapa d'assecat del sorbent

Es deixa circular aire durant uns minuts per llevar les restes de dissolvent de llavat i així millorar el rendiment de l'extracció.

Etapa d'elució de l'anàlit

Amb l'ajuda d'un dissolvent adequat, l'anàlit d'interès deixa d'interactuar amb el sòlid i és eluït del sorbent. És convenient que el volum de dissolvent afegit per a l'elució siga xicotet per tal d'aconseguir la màxima concentració de l'anàlit.

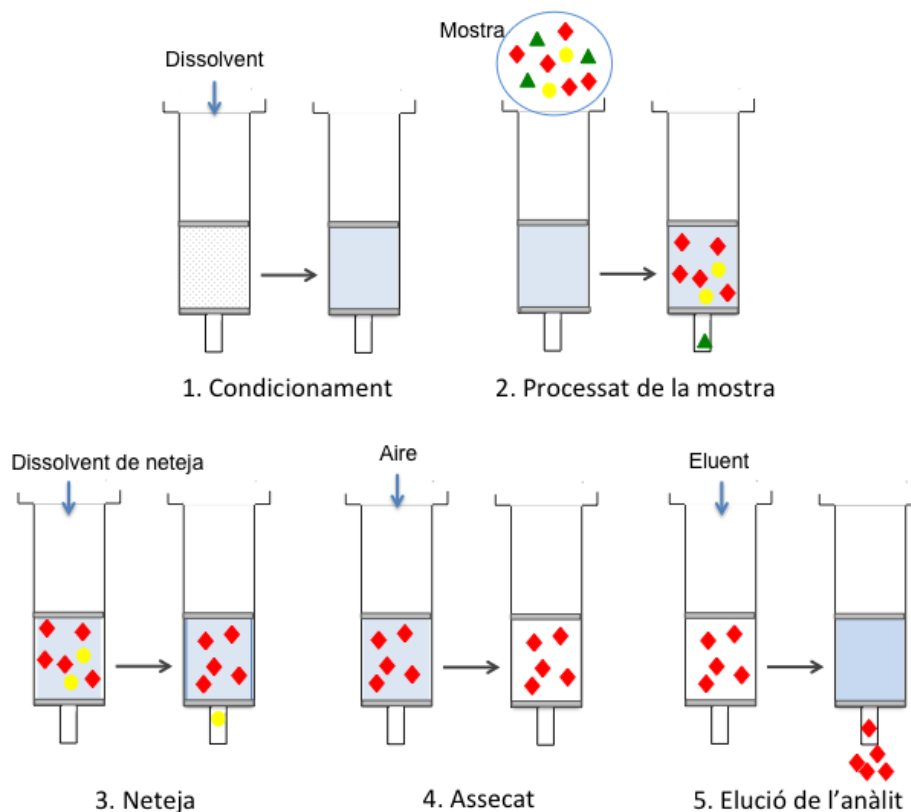


Figura 5: Etapes del procés d'extracció en fase sòlida (Font: pròpia).

Les diferents etapes es duen a terme en un col·lector múltiple (Figura 6) per a SPE connectat a una bomba de buit. El col·lector és un recipient de cristall amb una tapa que té diverses vàlvules on es col·loquen els cartutxos. Quan es vol fer el buit, el col·lector es tanca amb la tapa, s'encén la bomba de buit i s'obrin les vàlvules d'entrada. El líquid que passa pels cartutxos es rebutja si no interessa, o s'arreplega en recipients nets, com en l'etapa d'elució de la mostra.



Figura 6: Col·lector de buit per SPE (Font pròpia).

El sorbent

Generalment el sorbent és un sòlid granulat que es col·loca dins del cartutx entre dos discs porosos, que poden ser de vidre o de polietilè. Les característiques del sòlid emprat com a sorbent donaran lloc a diferent tipus d'interaccions amb els anàlits. Els sorbents poden ser apolars, polars, d'intercanvi iònic o d'exclusió per grandària.

Sorbents apolars

Els sorbents apolars són els adequats per a la preconcentració i neteja de compostos orgànics que hi ha en mostres líquides polars, com l'aigua o altres begudes. En aquest cas són les forces Van der Waals i les interaccions hidrofòbiques les que intervenen. Els anàlits són eluïts amb un dissolvent orgànic com per exemple metanol, acetonitril o acetona.

Els sorbents que s'utilitzen són l'octadecil (C_{18}), octil (C_8), etil (C_2), fenil, i ciclohexil. Entre ells, el més utilitzat és el C_{18} .

Sorbents polars

Els sorbents polars es basen en cadenes orgàniques que contenen grups funcionals polars com OH, NH_2 i CN. Amb aquests sorbents, quan la mostra passe només es quedaran retinguts els anàlits amb grups funcionals polars, com les amines, alcohols, i compostos amb heteroàtoms que poden interaccionar a través de ponts d'hidrogen o forces dipol-dipol. L'elució dels anàlits retinguts en aquests sorbents es realitza amb un dissolvent apolar.

També s'empren com a sorbents polars el gel de sílice ($\text{SiO}\cdot\text{H}_2\text{O}$) o l'alúmina ($\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$). Aquest tipus de sorbents s'empren habitualment en la purificació d'extractes orgànics per a la determinació de gran varietat de contaminants en mostres vegetals, teixits animals, sediments i sòls.

Sorbents d'intercanvi iònic

Aquests sorbents s'utilitzen en la preconcentració de compostos orgànics iònics o fàcilment ionitzables. Per tal que l'anàlit estiga en la seua forma iònica, l'extracció es realitza a un pH determinat, de forma que pugui interaccionar i quedar-se retingut en el sorbent. L'elució es realitza amb una dissolució reguladora d'un pH al qual l'anàlit no es reté.

Aquest procediment s'ha fet servir, per exemple, en la determinació d'anilines en aigües.

Sorbents d'exclusió molecular

Aquests sorbents permeten l'extracció dels compostos orgànics en funció de la seua mida molecular. En les partícules del sorbent, hi ha xicotets porus on només penetren les molècules de grandària similar de forma que, en afegir la mostra, les molècules grans passen pel sorbent sense quedar retingudes i les partícules xicotetes entren en els porus al passar, el que permet l'extracció.

Els sorbents més destacats són dextrà amb enllaços creuats de glicerina, o poli-acrilamida amb enllaços creuats de N,N'-metilen-bis-acrilamida. Aquests gels s'empren en la neteja de mostres biològiques, com el sèrum o el plasma, on s'eliminen les molècules grans, com les proteïnes i hidrats de carboni, que dificulten l'anàlisi de molècules xicotetes (anestèsics, drogues, etc).

1.4. Sorbents polimèrics

En les últimes dècades s'està investigant en l'ús de polímers sintètics com a sorbents per a les tècniques d'extracció en fase sòlida. Concretament, els polímers de metacrilat, que es sintetitzen de manera senzilla en el laboratori, s'han utilitzat per a l'extracció de diferents compostos orgànics d'interès. A més, durant la síntesi, aquests polímers poden modificar-se químicament per obtenir sorbents més selectius.

1.4.1. Síntesi de polímers de metacrilat

Hi ha diverses tècniques utilitzades per a la síntesi de polímers, com la polimerització de precipitació, suspensió, tècniques d'empelta, i en bloc. De totes elles, la polimerització en bloc és la més àmpliament utilitzada a causa de la seua senzillesa: només requereix mesclar els components necessaris en presència d'un dissolvent orgànic porogènic per obtenir finalment un polímer en forma de monòlit.

Posteriorment, aquest polímer es tritura i tamisa fins que les partícules siguin d'una grandària concreta, per a després empaquetar-lo en un cartutx per a la seua utilització com a sorbent per a extracció en fase sòlida.

Els següents components són necessaris per a la realització de la síntesi del polímer en bloc: un monòmer, un agent entrecreuant, un o més dissolvents porogènics i un iniciador. A continuació es descriuen la funció i les propietats de cadascun dels components.

Components de la mescla de polimerització

Monòmer i agent entrecreuant

El monòmer i l'agent entrecreuant són els compostos que formen l'estructura del polímer per reacció química. El monòmer dona volum al polímer i amb l'entrecreuat s'aconsegueix integritat estructural del monòlit.

L'agent entrecreuant (en anglès, *cross-linker*) uneix les cadenes de monòmers entre elles. En el cas d'aquest projecte, hem utilitzat l'etilenglicol dimetacrilat (EDMA) (Figura 7), que és un dels més utilitzats. Altres entrecreuants habituals són el divinilbenzé (DVB) i el trimetilolpropà trimetacrilat (TRIM).

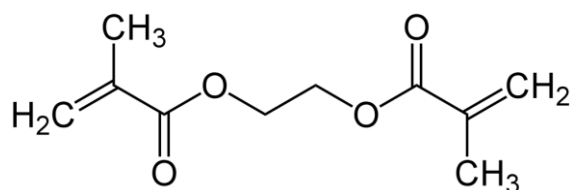


Figura 7. Estructura química de l'agent entrecreuant EDMA (Font: wikipèdia).

Dissolvent porogènic o porogen

El porogen genera les cavitats necessàries per donar permeabilitat al polímer, de forma que les mostres a tractar puguen travessar el polímer. El porogen determina l'àrea superficial, grandària i distribució dels porus en el polímer. La selecció del porogen es fa tenint en compte la seua capacitat per dissoldre els reactius de la síntesi, ja que és el dissolvent o mescla de dissolvents utilitzats en la polimerització.

Entre els porògens més emprats trobem dissolvents orgànics com l'acetonitril (ACN), el toluè o el cloroform.

Iniciador

L'iniciador és l'encarregat de desencadenar la reacció de polimerització. Existeixen dos mecanismes d'iniciació: mitjançant radiació ultraviolada (foto-iniciadors) o per acció tèrmica (termo-iniciadors). Amb una d'aquestes dos fonts d'energia, l'iniciador

produeix la formació de radicals lliures que provoquen la reacció de polimerització, que tindrà lloc en tres etapes: iniciació, propagació i terminació.

L'iniciador utilitzat en aquest estudi ha sigut l'azo-bis-isobutironitril (AIBN), i el mecanisme d'iniciació emprat ha sigut tèrmic.

Procés de formació del polímer

El procés de formació del polímer es du a terme en diverses etapes i s'inicia amb l'aplicació de radiació UV o calor, per tal que l'agent iniciador es descomponga i comence la polimerització. Després de la iniciació el monòmer forma una cadena polimèrica lineal que interactua amb l'agent entrecreuant per a formar una xarxa tridimensional rígida i estable. La reacció de polimerització es du a terme a temperatura elevada i acaba quan s'elimina la font de calor [15].

Una de les estratègies que permeten l'obtenció de sorbents selectius per a extracció en fase sòlida és la síntesi de polímers d'empremta molecular (MIP, de l'anglès *Molecularly Imprinted Polymer*). Aquests MIPs polimeritzen en presència del compost d'interès a analitzar (molècula plantilla), que deixa una empremta en l'estructura polimèrica quan, en l'última etapa de la preparació, s'elimina la molècula plantilla del polímer. D'altra banda, els polímers obtinguts en absència del compost plantilla s'anomenen NIP (de l'anglès *Non-Imprinted Polymer*).

En aquest treball s'han sintetitzat diversos polímers, tant en versió MIP com NIP, i s'ha comprovat la seua aplicabilitat per a l'extracció en fase sòlida del plaguicida diclofop-metil. A continuació s'expliquen més detalls referits a la preparació i característiques d'aquests polímers.

1.4.2. Polímers d'empremta molecular

Els MIPs són polímers macroporosos sintètics amb cavitats o llocs específics capaços de reconèixer una molècula concreta, anomenada molècula diana o plantilla (en anglès, *template*). El mecanisme d'interacció entre la molècula plantilla i la cavitat imita el mecanisme natural de reconeixement antígen-anticòs.

Aquests materials s'obtenen, com s'ha avançat, mitjançant la polimerització, en presència de la molècula d'interès, d'un o més monòmers funcionals, juntament amb un agent entrecreuant, que dóna lloc a una xarxa tridimensional altament entrelaçada al voltant de la molècula diana. Durant el procés de polimerització es generen interaccions específiques entre el monòmer funcional i la molècula plantilla. Quan ja s'ha obtingut el polímer, s'elimina la molècula plantilla mitjançant una etapa de llavat, i queden en l'estructura del polímer unes cavitats lliures (o punts d'unió selectius) que reconeixen el compost utilitzat en la formació del polímer [16].

En la figura 8 es mostra un esquema del procés d'obtenció d'un MIP. En primer lloc, la molècula plantilla (P) interactua amb el monòmer funcional (M), formant-se un complex estable entre el monòmer i la molècula plantilla (complex de pre-polimerització). Posteriorment, es forma una estructura tridimensional al voltant de la molècula per

polimerització entre l'entrecreuant (EC) i els monòmers. Finalment, la molècula plantilla s'elimina en l'etapa de llavat, deixant lliures els punts d'unió per captar l'anàlit selectivament a l'interior de la cavitat [16].

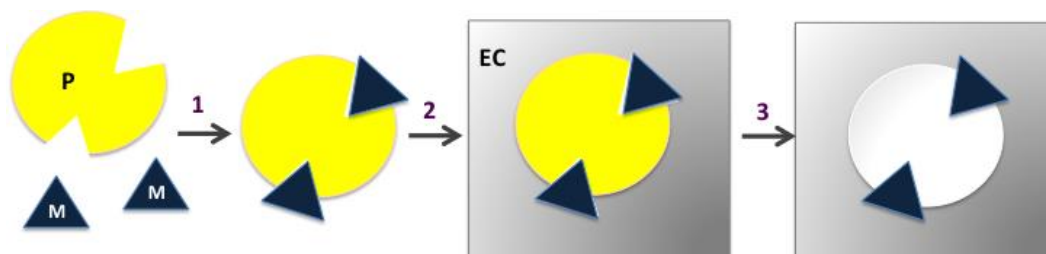


Figura 8: Esquema de la síntesi i neteja d'un MIP. P, molècula plantilla; M, monòmer i EC, entrecreuant (Font: pròpia).

Habitualment les interaccions entre el monòmer i la molècula plantilla que es generen en el complex de pre-polimerització són interaccions no-covalents (iòniques, de Van der Waals o punts d'hidrogen). En aquests casos, com que les interaccions monòmer-molècula que s'estableixen estan governades per un equilibri químic, és necessari que existisca un excés de monòmer, per desplaçar l'equilibri cap a la formació del complex monòmer-molècula [16]. En el nostre cas, la quantitat de monòmer respecte a la quantitat de molècula diana és de 4 a 1 [17].

En els últims anys s'ha incrementat l'ús dels polímers d'empremta molecular com a sorbents en cromatografia líquida d'alta resolució, o en el desenvolupament de nous sensors, però l'àrea on més s'han utilitzat els MIPs és com a sorbents per a extracció en fase sòlida. L'ús de MIPs per a SPE proporciona elevades recuperacions quantitatives de l'anàlit d'interès en eliminar de forma efectiva les interferències de la mostra i retenir de forma selectiva l'anàlit.

Selecció de la molècula plantilla i el monòmer en la síntesi d'un MIP

En la síntesi d'un MIP s'han de tenir en compte les característiques de la molècula plantilla per poder utilitzar els reactius adequats, capaços d'establir interaccions específiques entre el monòmer i la molècula diana.

La molècula plantilla és generalment l'anàlit d'interès. Quan el que es busca és preparar un MIP vàlid per a l'extracció d'un grup de compostos amb estructura química similar, es tria com a molècula plantilla un dels compostos de la família, atenent a criteris com que siga el majoritari en les mostres habituals o que la seua estructura coincidisca amb la base de la família de compostos. A més, la molècula plantilla ha de ser estable en les condicions de polimerització establides, i ha de tindre grups funcionals que interaccionen amb els monòmers funcionals. En el nostre cas la molècula seleccionada com a *plantilla* és l'herbicida diclofop-metil (Figura 1).

Finalment, l'elecció del monòmer es realitza tenint en compte les característiques de la molècula plantilla; com ja s'ha comentat, el monòmer ha de establir unions

específiques amb la molècula diana. En aquest estudi s'han emprat dos monòmers funcionals habituals, el 4-VP (4-vinilpiridina) i el MAA (àcid metacrílic), que poden establir interaccions per pont d'hidrogen i de van der Wals amb el diclofop-metil [19]. En la figura 9 es mostra la estructura molecular d'aquests monòmers, i en la figura 10 les interaccions que es poden generar entre el diclofop-metil i cadascun dels monòmers.

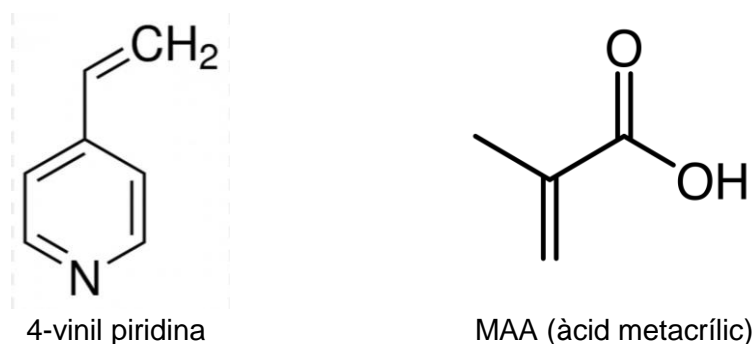


Figura 9. Estructura química dels dos monòmers funcionals emprats en aquest estudi (Font: wikipedia).

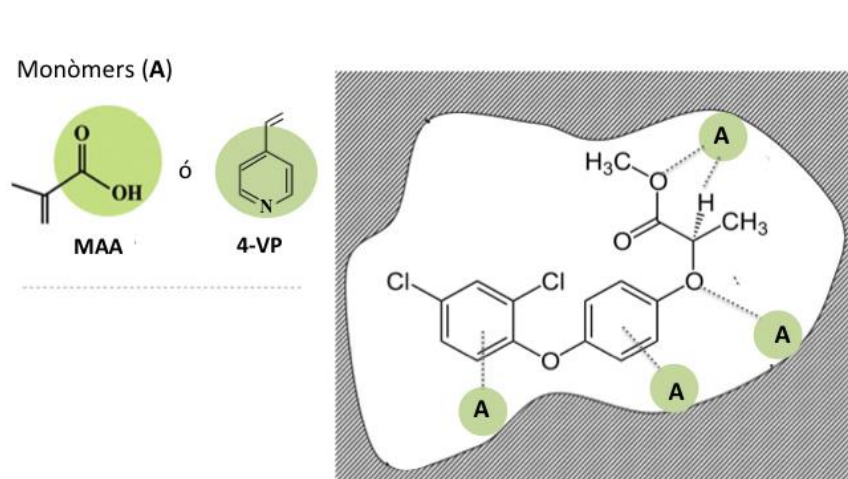


Figura 10. Interaccions específiques entre els monòmers funcionals i el diclofop-metil (Font modificada de [20].)

Eliminació del compost plantilla

Una vegada ha finalitzat la polimerització, es realitza el llavat del polímer per poder eliminar la molècula plantilla i així deixar lliures els llocs de reconeixement o cavitats selectives. En el llavat, és necessari un dissolvent que pugui trencar les interaccions entre la molècula plantilla i el monòmer.

L'extracció Soxhlet és la forma més utilitzada per a l'etapa de neteja del MIP, perquè permet fer el llavat d'un sòlid amb un dissolvent líquid a reflux i en continu. Així, la neteja del MIP pot dur-se a terme durant hores amb una baixa despesa en dissolvent.

2. Context

El Treball de Fi de Grau presentat s'emmarca dins de dos projectes d'investigació, un finançat per la Generalitat Valenciana, titulat "*Sistemas de separación basados en nuevos polímeros porosos y composites polímero-nanopartículas con aplicaciones industriales y medioambientales*", i un altre finançat pel Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats, titulat "*Desarrollo de materiales poliméricos funcionales en plataformas flexibles para aplicaciones medioambientales y toxicológicas*", concedit recentment en la convocatòria de 2018 de projectes del Programa estatal de R+D+i orientada als reptes de la societat.

El treball que ací presentem forma part dels estudis inicials que estan portant-se a terme en el grup de Química Analítica de Gandia (QUIMAG) en l'Escola Politècnica Superior de Gandia sobre la preparació de polímers d'empremta molecular.

3. Objectius

Els principals objectius del projecte són:

- Desenvolupar un mètode cromatogràfic per a la determinació individual del diclofop-metil, i un altre per a la separació i determinació d'un grup de 5 herbicides de la família dels ariloxifenoxipropiònics.
- Sintetitzar polímers d'empremta molecular i els seus corresponents polímers sense empremta utilitzant els monòmers MAA i 4-VP.
- Optimitzar l'extracció en fase sòlida de l'herbicida diclofop-metil emprant els diferents sorbents desenvolupats.
- Seleccionar el sorbent que permeta una extracció selectiva del diclofop-metil en les condicions d'extracció establertes
- Avaluar la capacitat d'extracció del sorbent seleccionat per a altres herbicides de la família dels ariloxifenoxipropiònics.
- Aplicar el sorbent seleccionat per a l'extracció de la mescla d'herbicides en mostres d'aigua senzilles additivades

4. Reactius, material i instrumentació

Els **reactius químics** emprats en la realització d'aquest projecte, de grau analític o superior, han sigut els següents:

- Acetona
- Acetonitril (ACN)
- Àcid acètic (AcH)
- Àcid clorhídric (HCl)
- Àcid metacrílic (MAA)
- Azo-bis-isobutironitril (AIBN)
- Cyhalofop-butil
- Diclofop-metil
- Dimetacrilat d'etilenglicol (EDMA)
- Etanol
- Fenoxaprop-etil
- Haloxyfop-metil
- Hidròxid de sodi (NaOH)
- Metanol (MeOH)
- Nitrogen (N₂ gas)
- Propaquizafop
- Toluè
- 4-vinilpiridina (4-VP)

Les dissolucions mare dels herbicides (de 1000 mg/L) es preparaven en ACN; les dissolucions de treball, amb les quals es van realitzar els estudis d'extracció en fase sòlida del diclofop-metil o la mescla d'herbicides, es preparaven en matrassos de 5 mL, amb una concentració d'herbicida de 0.50 mg/L en aigua Mili-Q.

Per a la polimerització i preparació dels cartutxos d'extracció en fase sòlida s'han emprat els següents **materials i aparells de laboratori**:

- Balança analítica amb 0.1 mg de precisió
- Bany d'ultrasons de GT Sonic
- Cartutxos de polietilè i vidres sinteritzats
- Col·lector per a SPE
- Dessecador
- Espàtules
- Estufa de P Selecta
- Filtres de tefló i niló, de 0.22 µm i 0.45 µm
- Morter ceràmic
- Sistema d'extracció Soxhlet
- Sistema de filtració al buit
- Tamisos de 200 µm de pas
- Vials de vidre de 15 mL
- Xeringues de 5 ml i 20 mL

L'**instrument** emprat per a l'anàlisi del diclofop-metil i altres herbicides en les diferents fraccions d'extracció en fase sòlida és un cromatògraf de líquids d'alta resolució de Agilent Technologies, Model Infinity 1200, equipat amb bomba quaternària, injector automàtic, columna Kinetex C18 (Phenomenex, diàmetre de les partícules 2.6 μm , longitud 10 cm, diàmetre intern: 4.6 mm), detector UV-vis de fila de díodes i sistema informàtic de recollida de dades.

5. Procediment experimental

A continuació es descriu el procediment experimental per a la síntesi dels diferents sorbents, la seua neteja, la preparació dels cartutxos per a SPE, el procediment d'SPE i la determinació cromatogràfica dels pesticides mitjançant el sistema HPLC. Aquests procediments s'han establert en el laboratori durant la realització d'aquest projecte; es descriuen només els procediments òptims.

Els procediments de preparació dels sorbents que es descriuen estan basats en els estudis d'Herrero-Hernández [18], on es prepararen polímers d'empremta molecular utilitzant un compost plantilla diferent per a l'extracció en fase sòlida de fenols i alguns herbicides de la família dels clorofenoxiàcids.

5.1. Síntesi dels polímers

Per a la preparació dels MIPs s'han de mesclar la molècula plantilla (diclofop-metil), el monòmer (4-VP o MAA) i l'agent entrecreuant (EDMA) en una proporció 1:4:20. A més, s'ha d'afegir el porogen (ACN o toluè) i l'iniciador (AIBN). La mescla es prepara en un vial de 15 mL i tots els reactius es pesen amb la balança analítica.

En primer lloc, es pesen el diclofop-metil i el monòmer (MAA o 4-VP), i s'hi afegeix una part del porogen (1-2 mL) en el vial. A continuació, es deixen en contacte l'herbicida i el monòmer durant un temps determinat, perquè es pugen establir les interaccions específiques entre ells i es forme el complex de pre-polimerització. Després, s'afegeixen al vial l'agent entrecreuant, la resta del porogen i l'iniciador. Es tapa el vial i es posa 3 min al bany d'ultrasons i, posteriorment, es passa per la mescla $N_2(g)$ durant 10 min per tal d'eliminar l'oxigen. Finalment, el vial tapat amb la mescla de polimerització es posa a l'estufa 24 hores a 60°C.

De manera simultània a la síntesi del MIP, es prepara el NIP (polímer sense empremta), que serà el polímer de control. Per a la seua preparació s'utilitzen els mateixos reactius que en la preparació del MIP a excepció de la molècula plantilla. Per tant, per a la preparació del NIP es mesclen en un vial de 15 mL el monòmer, l'agent entrecreuant, el porogen i l'iniciador. Després, es posa el vial tapat 3 min al ultrasons i posteriorment, es passa per la mescla $N_2(g)$ durant 10 min. Finalment, el vial amb la mescla de polimerització es posa a l'estufa 24 hores a 60°C. En la figura 11 es mostra una foto dels vials d'un polímer MIP i un NIP en traure'ls de l'estufa després de la polimerització. S'observa que s'ha format un bloc sòlid blanc, el polímer, i per dalt han quedat les restes de reactius que han quedat sense reaccionar. Encara que aparentment són iguals, s'espera que en l'estructura del MIP hi haja cavitats d'interacció específiques amb el diclofop-metil, que no hi hauran en el NIP.

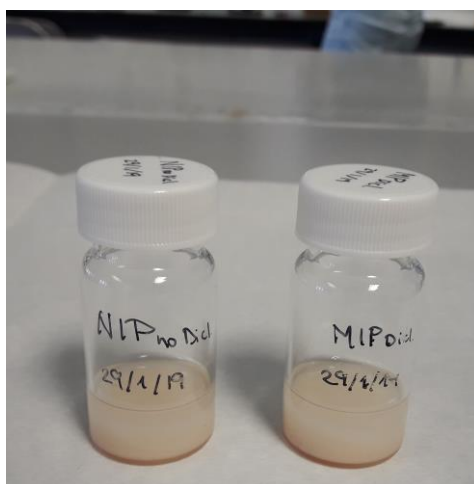


Figura 11. Foto del NIP i MIP després de la polimerització (Font pròpia).

A continuació s'especifica la composició dels polímers MIP i NIP realitzats en el projecte amb els dos monòmers emprats.

5.1.1. Polímers sintetitzats amb el monòmer àcid metacrílic

Amb el MAA s'han preparat el polímer amb empremta molecular (que porta a la mescla el compost plantilla, diclofop-metil) i el polímer sense empremta. En la preparació del MIP la proporció molar "*plantilla:monòmer:entrecruant*" ha sigut 1:4:20. En la taula 1 es mostra les quantitats de cada component en la mescla de polimerització utilitzades per a la preparació del MIP i del NIP amb aquest monòmer. En tots els casos s'ha utilitzat un total de 6 mL d'ACN com a porogen.

Taula 1 . Composició dels polímers MIP i NIP preparats amb MAA.

Compost (funció)	mmols	Massa (g)	
		MIP	NIP
Diclofop-metil (<i>plantilla</i>)	0.2	0.0696	-
MAA (monòmer)	0.8	0.0688	0.0688
EDMA (<i>entrecruant</i>)	4.0	0.7929	0.7929
AIBN (iniciador)	0.04	0.0066	0.0066

Amb aquest monòmer, s'han preparat dos MIPs, emprant diferents temps de contacte entre la molècula plantilla i el monòmer: en un cas, el temps de contacte ha sigut de 20 minuts (*MIP-MAA-20 min*), i en l'altre cas, ha sigut de 24 hores (*MIP-MAA-24 h*).

5.1.2. Polímers sintetitzats amb el monòmer 4-vinilpiridina

Emprant el 4-VP com a monòmer, també s'han sintetitzat dos MIPs diferents emprant diferents temps de contacte monòmer-plantilla, i un polímer NIP sense empremta.

La proporció molar “*plantilla:monòmer:entrecreuant*” ha sigut també de 1:4:20 en el MIP, com pot observar-se en la taula 2, on es mostra la composició dels polímers. En aquest cas, el porogen ha sigut el toluè, del qual s'han utilitzat un total de 5 mL.

Taula 2. Composició dels polímers MIP i NIP preparats amb 4-VP.

Compost (funció)	mmols	Massa (g)	
		MIP	NIP
Diclofop-metil (<i>plantilla</i>)	0.2	0.0696	-
4-VP (monòmer)	0.8	0.0841	0.0841
EDMA (<i>entrecreuant</i>)	4.0	0.7929	0.7929
AIBN (iniciador)	0.1	0.0165	0.0165

En el cas dels dos MIPs preparats amb 4-VP, el temps de contacte entre la molècula plantilla i el monòmer ha sigut de 20 min o de 4 hores, pel que distingirem entre el *MIP-4-VP-20 min* i el *MIP-4-VP-4 h*, respectivament.

Si ens fixem en la quantitat d'iniciador emprat per a la polimerització amb 4-VP (taula 2) podem observar que ha sigut necessari afegir una major quantitat d'AIBN amb aquest monòmer que amb el MAA (taula 1) per tal de completar la polimerització.

5.2. Neteja dels polímers

Tant el NIP com el MIP han de netejar-se després de la polimerització. Per poder netejar el polímer, en primer lloc es trauen els vials de l'estufa i es deixen refredar. En el cas del NIP l'objectiu de la neteja és eliminar tots aquells compostos que no hagen reaccionat: porogen i restes de monòmer, entrecreuant i iniciador. En el MIP amb el procés de neteja s'ha d'eliminar, a més dels components anteriorment esmentats, la molècula plantilla. A continuació es descriu com es realitza la neteja en cada cas.

5.2.1. Neteja del NIP

Per a netejar el NIP s'utilitza un sistema de filtració al buit com el que es mostra en la figura 12. Sobre el matràs Erlenmeyer es col·loquen dos peces unides per una pinça enmig de les quals se situa un filtre de tefló de 0.22 µm. El polímer que volem netejar es posa sobre el filtre i s'hi va afegint el dissolvent de llavat, en el nostre cas acetona,

en xicotetes fraccions. Per altra banda, com s'observa en la figura 12, en una de les peces situades sobre el matràs hi ha una eixida on es fica un tub connectat a la bomba de buit. Quan aquesta es posa en marxa, comença a fer el buit de manera que el líquid que hi haja en la part superior de l'embut cau en el matràs i només queda el sòlid sec en el filtre.

S'han utilitzat al voltant de 100 mL d'acetona en fraccions de 20 mL per a netejar el polímer. Per a millorar el procés de neteja, després de cada porció de 20 mL d'acetona que afegim al sistema, posem en contacte el sòlid amb el dissolvent de llavat amb ajuda d'una espàtula.



Figura 12. Sistema de filtració al buit (Font pròpia).

Per tal d'assecar el polímer, es col·loca el filtre en una placa petri i es deixa en l'estufa a uns 70°C aproximadament durant 1 h. Després, es trau i es deixa refredar en el dessecador uns 15 min.

5.2.2. Neteja del MIP

Com s'ha mencionat anteriorment, en la neteja del MIP s'ha d'eliminar la molècula plantilla, deixant lliures les cavitats d'interaccions específiques.

El sistema d'extracció Soxhlet permet extraure un component present en un sòlid que siga soluble en el dissolvent emprat per al llavat (Figura 13). L'extractor Soxhlet consta de tres parts connectades: un matràs en la part inferior, on es posa el dissolvent de neteja, que està situat sobre una manta calefactors; la cambra d'extracció, que és la peça central situada sobre el matràs, on es col·loca el MIP sòlid dins d'un cartutx de cel·lulosa (didal); i un refrigerant de reflux, situat en la part superior. La peça central està connectada al matràs per dos tubs: un dels tubs, el més ample, l'altre, més estret i amb forma de sífó. El primer transporta el vapor produït en escalfar el matràs fins a la part superior del recipient, on condensen els vapors del

dissolvent que cauen sobre el sòlid. Una vegada que s'ompli amb dissolvent la part on es troba el polímer, el líquid torna al matràs pel sifó, de manera que va concentrant-se progressivament en el matràs inferior el component que s'extrau del sòlid (soluble en el dissolvent i menys volàtil que aquest). Aquest procés pot repetir-se les vegades necessàries fins l'extracció completa del component d'interès, en el nostre cas el diclofop-metil del MIP [21].

La neteja amb el sistema Soxhlet es du a terme durant 24 hores fins la completa neteja del polímer. La neteja del MIP es completa en 2 etapes: primer amb una mescla MeOH:AcH (90:10) (150 mL) durant 20 hores; i després, es canvia el dissolvent de llavat per ACN i es continua l'extracció durant 4 hores.

Per a comprovar si s'ha eliminat correctament el compost plantilla, s'arreglen mostres de dissolvent de la cambra d'extracció (Figura 13) cada cert temps. La neteja es realitza fins que no es detecta la presència de diclofop en analitzar-lo en el sistema cromatogràfic.

Finalment, es col·loca el didal que conté el MIP net en l'estufa a 70°C durant 1 h. Després, es deixa refredar en el dessecador durant uns 15 min.

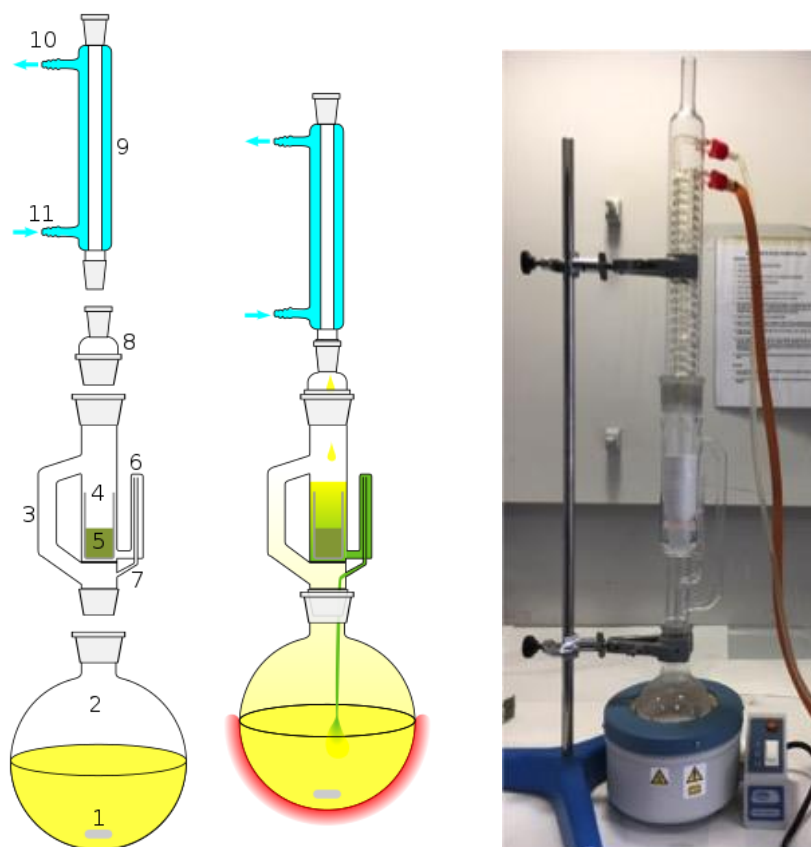


Figura 13. a) Representació esquemàtica d'un extractor Soxhlet: 1: Grànuls anti-bombolla, 2: Matràs, 3: Via de destil·lació, 4: Cambra d'extracció, 5: Didal amb el sòlid, 6: Sifó superior, 7: Sortida del sifó, 8: Adaptador d'expansió, 9: Condensador, 10: Eixida del circuit de refrigeració, 11: Entrada del circuit de refrigeració (Font: By Quantockgoblin, SVG adaptation by Slashme - http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor, Domini públic). b) Foto de l'equip Soxhlet emprat, sense adaptador d'expansió (Font pròpia).

5.3. Preparació dels cartutxos d'extracció en fase sòlida

Després de la neteja dels polímers MIP i NIP es preparen els cartutxos. Els polímers obtinguts es molturen amb el morter ceràmic per obtenir partícules més fines i després es tamisen (amb un tamís de 200 µm de pas). El sòlid resultant s'utilitzarà per preparar els cartutxos.

Els cartutxos es preparen en xeringues de polietilè i el sòlid s'empaqueta entre dos discs porosos. El primer pas és col·locar un dels discs en la base del cartutx, perquè no caiga el sòlid quan el pesem. El segon pas es pesar 75 mg del polímer emprant la balança analítica i, finalment, es col·loca el segon disc.

Així, es poden preparar tants cartutxos com siguin necessaris. Nosaltres hem preparat 4 rèpliques de MIP i de NIP. Abans del primer ús, es sotmet als cartutxos a un llavat amb 5 mL de metanol, 5 mL de MeOH:AcH i 5 mL d'ACN per tal d'aconseguir un empaquetament adequat.

5.4. Procés d'extracció en fase sòlida

Una vegada preparats els cartutxos es col·loquen en el col·lector múltiple per a SPE amb aspiració al buit per poder realitzar l'extracció del diclofop-metil, o el grup d'herbicides seleccionat, mitjançant les etapes de condicionament, llavat, processat, assecat i elució.

Ací s'explicarà només el cas òptim que s'ha dut a terme en l'estudi per a realitzar el procés d'extracció en fase sòlida del plaguicida amb els cartutxos preparats:

- 1) Condicionament del cartutx amb 2.5 mL d'acetona i 15 ml H₂O MiliQ
- 2) Processat de la mostra: 5mL de dissolució de l'herbicida o grup d'herbicides
- 3) Llavet del cartutx amb 2.5 mL d'aigua MiliQ
- 4) Assecat amb aire durant 15 minuts
- 5) Elució de l'herbicida amb 5 mL d'acetonitril: es passen 2.5 mL d'ACN, es deixa assecat durant 2 minuts i finalment es passen els 2.5 mL restants (s'enrasa amb ACN en el cas que allò obtingut en l'elució no arribe als 5 mL)

5.5. Anàlisi cromatogràfic

Una vegada s'ha fet el procés de SPE, l'extracte obtingut de l'elució es filtra amb filtres de xeringa de niló o tefló de 0.22 µm i es situa en vials d'HPLC per realitzar-ne l'anàlisi cromatogràfica.

S'empra un programa cromatogràfic diferent en funció de si es pretén analitzar el diclofop-metil de forma individual o en una mescla d'herbicides.

5.5.1. Determinació individual del diclofop-metil

En l'estudi de l'extracció individual del diclofop-metil amb els cartutxos dels polímers MIP i NIP preparats s'aplicà un programa cromatogràfic d'elució isocràtica, amb una fase mòbil de composició constant.

La fase mòbil, composta per ACN:aigua (70:30), es passava a una velocitat de flux de 1 mL/min, el volum d'injecció era de 20 µL i es mesurà l'absorbància a una longitud d'ona de 230 nm; el temps d'anàlisi era de només 5 min. Abans de seleccionar aquesta fase mòbil com la més adequada, es provaren altres proporciones ACN:aigua (60:40, 50:50), i es va seleccionar la fase mòbil amb un 70% d'ACN perquè permetia la determinació de l'herbicida en el temps més curt sense solapar amb el pic que ix en el front del cromatograma.

En la figura 14 es mostra un exemple d'un cromatograma de diclofop-metil amb aquest mètode isocràtic. En el cromatograma resultant es mesura l'àrea de pic del diclofop-metil, paràmetre relacionat amb la concentració d'herbicida.

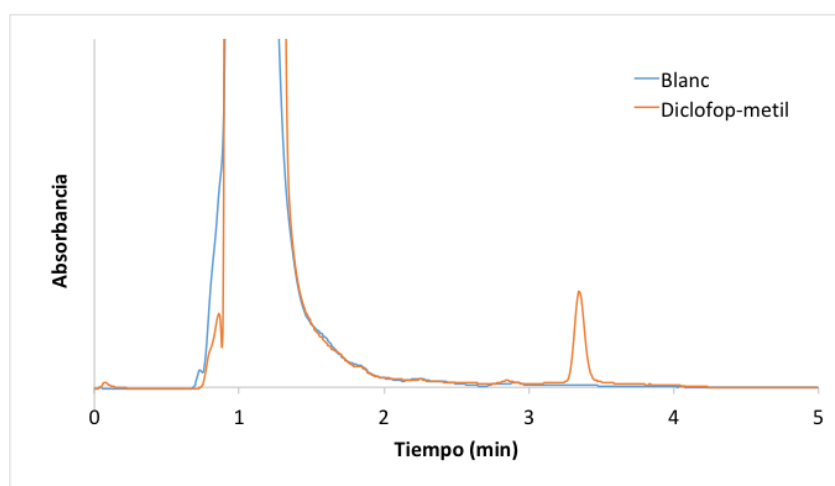


Figura 14. Cromatograma de l'anàlisi del diclofop-metil dissolt en ACN amb el mètode isocràtic. Temps de retenció: 3 min.

Estudi de la recuperació del procediment d'extracció en fase sòlida

Per establir el percentatge de recuperació (%R) del diclofop-metil en els processos de SPE en les diferents condicions que s'assagen, es compara l'àrea de pic del patró sotmès al procés d'extracció amb l'àrea de pic del patró de diclofop injectat directament en el cromatògraf.

$$\%R = \frac{Area_{patró\ SPE}}{Area_{patró\ sense\ SPE}} \times 100$$

Així, es va preparar una sèrie de 3 patrons de 0.5 mg/L diclofop-metil en aigua, en aforats de 5 mL, que es processaren amb els cartutxos aplicant el procediment d'SPE.

Per altra banda, es preparen 3 dissolucions aquoses de diclofop-metil de la mateixa concentració (0.50 mg/L) que directament s'injectaren en el sistema HPLC; aquests són els patrons de referència.

En el cromatògraf s'analitzaren amb el programa isocràtic tant les dissolucions patró de referència com les dissolucions obtingudes del procediment de SPE per a cada estudi. I es va calcular el %R emprant la fórmula anterior amb el valor mitjà de les àrees del patró amb i sense SPE.

5.5.2. Determinació d'una mescla d'ariloxifenoxipropionics

En la determinació d'una mescla de cinc pesticides de la família dels ariloxifenoxipropionics (cyhalofop-butil, diclofop-metil, fenoxaprop-etil, haloxyfop-metil i propaquizafop) va ser necessari l'ús d'un mètode cromatogràfic amb elució per gradient.

El mètode de gradient consisteix en el canvi gradual de la composició de la fase mòbil al llarg de l'anàlisi. Amb aquest mètode és possible aconseguir una bona eficiència en la separació de diversos compostos presents en una mescla.

Les característiques del gradient òptim, amb fase mòbil ACN:aigua, que permet la separació dels cinc pesticides en 15 min es mostren en la taula 3. La fase mòbil s'inicia amb una composició de 40% ACN durant 4 min, canvia a 65% en 1 minut, mantenint-se durant 5 min i un minut després torna a les condicions inicials, 40% ACN. Finalment, es manté en aquestes condicions el sistema durant 3 min perquè el sistema s'estabilitze abans de la següent injecció.

Taula 3: Programa de gradient per a l'anàlisi de la mescla de cinc plaguicides

Temps de anàlisi (min)	%ACN	%Aigua
0	40	60
4	40	60
5	65	35
10	65	35
11	40	60
15	40	60

L'anàlisi cromatogràfica es realitzà amb una velocitat de flux de 1 mL/min, el volum d'injecció era de 20 µL i es registrà l'absorbància a 230 nm. En la figura 15 es mostra un exemple d'un cromatograma obtingut amb el gradient òptim.

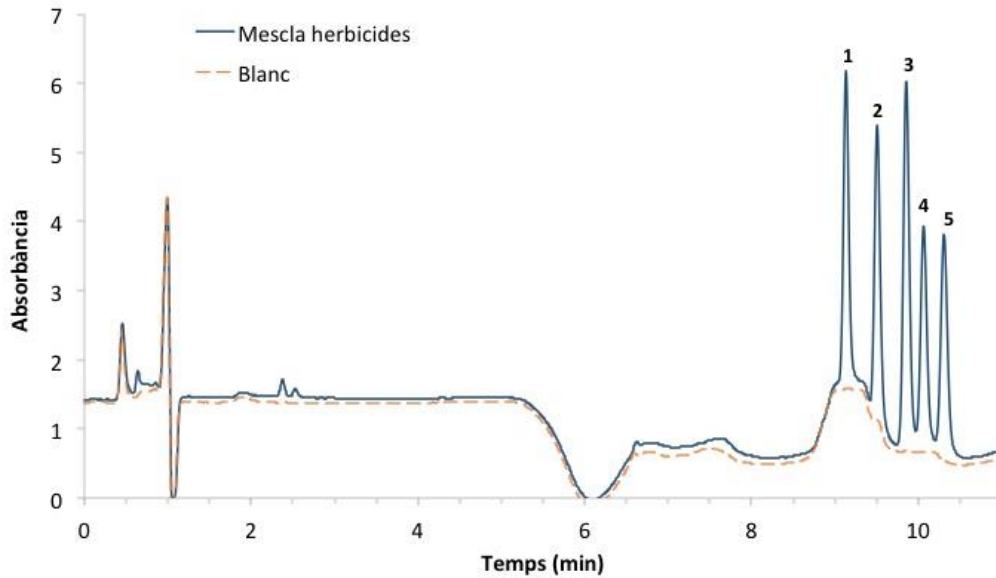


Figura 15. Cromatograma d'una mescla dels cinc herbicides de la família del diclofop-metil amb el gradient òptim: 1, haloxyfop-metil (9.12 min); 2, fenoxaprop-etil (9.50 min); 3, propaquizafop (9.85 min); 4, cyhalofop-butil (10.07 min) i 5, diclofop-metil (10.31 min) (Font: pròpia).

Estudi de la recuperació del procediment d'extracció en fase sòlida

Per a la determinació del %R de cadascun dels herbicides de la mescla es treballa de la mateixa manera que per al %R del diclofop-metil, preparant dissolucions de mescla dels cinc herbicides ariloxifenoxipropiònics amb una concentració de 0.50 mg/L de cadascun d'ells.

6. Resultats i discussió

A continuació es detallen els estudis d'extracció que s'han realitzat amb els cartutxos d'SPE sintetitzats amb els monòmers de MAA o 4-VP amb un temps de contacte monòmer-plantilla de 20 min, 4 h o 24 h.

Volem establir si existeix un comportament diferenciat entre els polímers MIP i NIP en el procés d'extracció en fase sòlida del diclofop-metil. I si es així, determinar quin dels dos monòmers funcionals utilitzats presenta unes interaccions específiques més intenses amb l'herbicida utilitzat com a molècula plantilla.

Els estudis s'han fet sempre per triplicat, obtenint un valor mitjà de %R amb la seua desviació estàndard.

6.1. Estudi preliminar: selecció de l'eluent d'SPE

En primer lloc es va fer un estudi preliminar per a establir el dissolvent amb el qual la recuperació en l'etapa d'elució del diclofop-metil fora quantitativa, és a dir, propera al 100%. Es provaren 3 eluents: MeOH:AcH (90:10), acetona i acetonitril.

El procediment d'SPE es va realitzar amb els sorbents MIPs preparats amb el monòmer MAA o 4-VP. El procés d'extracció es va aplicar a dissolucions de diclofop-metil de 0.5 mg/L i es va realitzar com s'explica en l'apartat 5.4. Per a l'etapa d'elució, s'han emprat 5 mL dels eluents anomenats.

En la taula 4 es mostren els percentatges de recuperació de diclofop-metil amb els MIPs de MAA i 4-VP en les 3 condicions d'elució assajades.

Taula 4. Percentatges de recuperació al realitzar l'SPE amb els MIPs de MAA i 4-VP amb diferents dissolvents en l'etapa d'elució.

Dissolvent d'elució	%R \pm s	
	MIP MAA (n=3)	MIP 4-VP (n=3)
MeOH:AcH (90:10)	72 \pm 10	91 \pm 10
Acetona	87 \pm 9	103 \pm 10
ACN	80 \pm 6	85 \pm 7

Com es veu en la taula 4, en conjunt, els millors resultats de recuperació s'obtenen amb acetona com eluent, amb recuperacions quantitatives (>85%) amb els dos tipus de polímer. Els resultats obtinguts amb l'acetonitril són lleugerament inferiors i amb la mescla MeOH:AcH (90:10) s'aconsegueix bona recuperació amb el MIP de 4-VP però els pitjors resultats per al MIP de MAA. A la vista dels resultats, es seleccionà com a eluent acetona (5 mL) per a estudis posteriors.

6.2. Influència de l'etapa de neteja d'SPE

Es volia trobar una situació on el dissolvent emprat en l'etapa de neteja d'SPE s'emportés totes les molècules amb interaccions no específiques amb el sorbent. Si es trobaren unes condicions de neteja en què el NIP no reté bé al diclofop-metil i el MIP el reté quantitativament, es demostraria l'existència d'interaccions específiques entre l'herbicida i el compost plantilla creades durant la polimerització del MIP.

Es va estudiar la influència del dissolvent en l'etapa de neteja amb els dos NIPs preparats amb el monòmer MAA o 4-VP. Els dissolvents de llavat estudiats van ser aigua, diclorometà, dissolucions aquoses de diferent pH, mescles MeOH:aigua i mescles ACN:aigua. En tots els casos el procés d'extracció es va realitzar com s'explica en l'apartat 5.4 emprant en l'etapa d'elució 5 mL d'acetona.

6.2.1. Dissolvent de neteja: diclorometà

En primer lloc es va emprar el diclorometà com a dissolvent per a l'etapa de neteja [18] i s'ha fet l'estudi amb els NIP i el MIP dels dos monòmers. Després d'analitzar amb el cromatògraf la dissolució obtinguda en l'etapa d'elució, la quantitat de diclofop-metil recuperada va ser mínima, ja que en el cas del MAA només es recupera un 3% de l'herbicida amb el NIP i un 10% amb el MIP, i amb el 4-VP un 7% amb el NIP i 12% amb el MIP. Per tant, el diclorometà no es pot utilitzar com a dissolvent en l'etapa de llavat, ja que elimina l'herbicida retingut en el sorbent del cartutx pràcticament en la seua totalitat tant emprant els NIPs com els MIPs.

6.2.2. Dissolvent de neteja: dissolucions aquoses de diferent pH

Aquesta prova s'ha fet només amb els NIPs, provant com a dissolvent de llavat 4 dissolucions aquoses de diferent pH (3, 5, 7 i 9). El procés d'SPE es va realitzar com s'explica en l'apartat 5.4, però utilitzant 2.5 mL de dissolució aquosa de pH 3, 5, 7 o 9 en l'etapa de neteja.

En la taula 5 es mostren els percentatges de recuperació de l'herbicida diclofop-metil en cada cas. Com es pot observar, les recuperacions foren al voltant del 100% en tots els casos, entre el 97% i el 115%, tant per a NIP de MAA com per al de 4-VP. Per tant, pareix que les dissolucions amb diferent pH no permeten eliminar les interaccions no-específiques ja que el diclofop-metil no s'ha perdut en l'etapa de neteja i s'extrau del NIP quantitativament en l'etapa d'elució.

Taula 5. Percentatges de recuperació en realitzar el SPE amb els NIPs de MAA i 4-VP amb dissolucions de diferent pH en l'etapa de neteja

pH	% R \pm s (n=3)	
	NIP MAA	NIP 4VP
3	97 \pm 5	104 \pm 14
5	103 \pm 8	107 \pm 8
7	97.0 \pm 0.3 (n=2)	104 \pm 0.5
9	99 \pm 15	115 \pm 17

6.2.3. Dissolvent de neteja: mescles metanol:aigua

Com en el cas anterior, el procediment d'SPE es va realitzar amb els sorbents NIP preparats amb MAA i amb 4-VP, i l'extracció es va realitzar com s'explica en l'apartat 5.4, però utilitzant en l'etapa de neteja 2.5 mL de dissolució mescla MeOH:aigua amb el percentatge de MeOH que s'indica en la taula 6: 20%, 40%, 60%, 80% i 100%.

Com es pot observar en la taula 6, el comportament del NIP de MAA i del NIP de 4-VP és diferent en alguns casos. Encara que en ambdós NIPs hi ha condicions en les quals la recuperació del diclofop-metil és propera al 100%, en el cas del NIP de MAA les pèrdues de l'herbicida són considerables (>40%) quan en l'etapa de neteja s'empren dissolucions amb un percentatge de MeOH igual o superior al 80%. D'altra banda, amb el NIP de 4-VP les pèrdues són superiors al 40% quan es llava el cartutx amb dissolucions de metanol amb un percentatge igual o superior al 60%. En l'apartat 6.3. es mostrarà el comportament del MIP en alguna de les condicions en les que es produeixen pèrdues al emprar el NIP, per veure si l'extracció amb el MIP aporta millores en l'extracció.

Taula 6. Percentatges de recuperació en realitzar l'SPE amb els NIPs de MAA i 4-VP amb mescles MeOH:aigua.

% Metanol	% R \pm s (n=3)	
	NIP MAA	NIP 4VP
20	107 \pm 10	104 \pm 3
40	98 \pm 3	89 \pm 4
60	90 \pm 10 (n=2)	59 \pm 6 (n=2)
80	62 \pm 6	67 \pm 8
100	27 \pm 7	-

6.2.4. Dissolvent de neteja: mescles acetonitril:aigua

El procediment d'SPE és el que s'explica en l'apartat 5.4, però utilitzant en l'etapa de neteja 2.5 mL de dissolució amb el percentatge d'ACN que apareix en la taula 7: 10%, 25%, 40%, 50%, 60% i 100%. En aquest cas es realitzà l'SPE amb els NIPs i per duplicat.

En la taula 7 es mostren els resultats del %R obtinguts amb els NIPs de MAA i pot observar-se que la recuperació es troba al voltant del 40% quan la neteja es realitza amb dissolucions amb un percentatge d'ACN del 50% o superior.

Taula 7. Percentatges de recuperació en realitzar l'SPE amb els NIPs de MAA amb dissolucions de diferent percentatge d'acetonitril

% Acetonitril	% R \pm s (n=2)
10	95 \pm 13
25	105 \pm 4
40	92 \pm 5
50	39 \pm 3
60	41 \pm 3
100	44 \pm 5

D'altra banda, amb el NIP de 4-VP la recuperació de l'herbicida deixa de ser quantitativa també quan el dissolvent de neteja té un 50% d'acetonitril, amb un %R=73%, sent encara menor per a dissolucions amb concentracions majors d'ACN (Taula 8), amb recuperacions al voltant del 20%.

Taula 8. Percentatges de recuperació en realitzar l'SPE amb els NIPs de 4-VP amb mescles ACN:aigua

% Acetonitril	% R \pm s (n=2)
10	105 \pm 2
25	115 \pm 2
50	65 \pm 14
80	23 \pm 5
100	16 \pm 6

En l'apartat 6.3. es mostrarà el comportament del MIP en alguna de les condicions en les que es produeixen pèrdues al emprar el NIP, per veure si l'extracció amb el MIP aporta millores en l'extracció.

6.3. Comparació del comportament NIP-MIP en l'extracció del diclofop-metil

Una vegada s'ha estudiat el comportament dels NIPs amb diferents dissolucions de neteja, es passarà a estudiar les parelles MIP-NIP de cada tipus de monòmer només amb alguns dissolvents de llavat, per provar si existeix alguna diferència en el comportament en la retenció del diclofop-metil entre el NIP i el MIP que pugen explicar l'existència d'interaccions específiques entre l'herbicida i el MIP. Aquest estudi es va realitzar amb els *MIP-MAA-20 min* i *MIP-4-VP-20min*.

6.3.1. Comparació amb els polímers sintetitzats amb àcid metacrílic

El procediment d'SPE amb els cartutxos de MAA és el mateix explicat a l'apartat 5.4, però utilitzant en l'etapa de neteja 2.5 mL de la dissolució que apareix a la taula 9, i 5 mL d'acetona en l'etapa d'elució.

En la taula 9 apareixen els resultats del %R obtinguts en cada cas i per poder apreciar bé la diferència de comportament en la retenció entre el NIP i MIP, hi ha una columna on s'ha calculat la diferència entre la recuperació del MIP i la del NIP ($\text{Diferència} = \%R_{\text{MIP}} - \%R_{\text{NIP}}$), de manera que un valor positiu indica que existeix una major retenció en el polímer d'empremta molecular que en el polímer sense empremta, indicant l'existència d'interaccions específiques en el MIP.

Taula 9. Percentatge de recuperació en realitzar l'SPE amb els NIP i MIP de MAA amb diferents dissolucions en l'etapa de neteja

Dissolució de neteja	% R \pm s (n=2)		Diferència
	MIP	NIP	
Aigua	87 \pm 9	93 \pm 4	-6
ACN 10%	77 \pm 3	95 \pm 13	-18
ACN 50%	47 \pm 9	39 \pm 3	8
MeOH 20%	97 \pm 10	107 \pm 10	-10
MeOH 80%	62 \pm 12	62 \pm 6	0
MeOH 100%	35 \pm 12	27 \pm 7	8

A partir dels resultats de la taula 9 podem concloure que les interaccions específiques entre el diclofop-metil i el MIP de MAA només permeten retenir lleugerament més del plaguicida quan el dissolvent emprat a l'etapa de neteja és ACN 50% i MeOH 100%, encara que les diferències són molt menudes i la recuperació de l'herbicida no és quantitativa amb el MIP en cap dels casos.

6.3.2. Comparació amb els polímers sintetitzats amb 4-vinilpiridina

S'ha realitzat un estudi similar amb els polímers preparats amb el monòmer 4-VP. El procediment d'SPE amb els cartutxos és el mateix explicat a l'apartat 5.4, però utilitzant en l'etapa de neteja 2.5 mL de la dissolució que apareix a la taula 10 i 5 mL d'acetona en l'etapa d'elució; amb cada condició de neteja el procediment s'ha realitzat per triplicat.

Taula 10. Percentatge de recuperació en realitzar l'SPE amb els NIP i MIP de 4-VP amb diferents dissolucions en l'etapa de neteja

Dissolució de neteja	% R \pm s (n=3)		Diferència
	MIP	NIP	
Aigua	103 \pm 10	89 \pm 6	14
ACN 10%	99 \pm 6	105 \pm 2	-6
ACN 50%	50 \pm 9	65 \pm 14	-15
MeOH 20%	108 \pm 15	104 \pm 3	4
MeOH 80%	75 \pm 3	67 \pm 8	8

A partir dels resultats de la taula 9 podem concloure que les interaccions específiques proporcionen diferències de recuperació positives del 14% entre NIP i MIP quan el dissolvent emprat a l'etapa de neteja és aigua. A més, en aquestes condicions, la recuperació amb el MIP és quantitativa.

En la resta de condicions, la diferència entre el comportament del MIP i el NIP és més menuda o negativa, el que indica que no predominen les interaccions específiques.

6.4. Estudi de la influència del temps de contacte plantilla-monòmer

Amb l'objectiu de veure si és possible que existisquen diferències més importants entre les respostes de retenció dels sorbents preparats, es sintetitzaren nous polímers prolongant el temps de contacte entre la molècula plantilla i el monòmer (formació del complex de pre-polimerització), tal com s'ha detallat en la secció 5.1. A continuació es comenten els resultats obtinguts.

El procediment d'SPE amb els cartutxos és el que s'ha explicat en l'apartat 5.4, utilitzant en l'etapa de neteja 2.5 mL de la dissolució que apareix en la taules corresponents (taules 11 i 12) i 5 mL d'acetona en l'etapa d'elució.

6.4.1. Influència amb polímers sintetitzats amb àcid metacrílic

Es va preparar un MIP deixant en contacte el diclofop-metil (molècula plantilla) i el monòmer MAA durant 24 h en l'etapa de formació del complex de pre-polimerització. Posteriorment, es va estudiar el seu comportament com a sistema d'extracció en fase sòlida de l'herbicida emprant diferents condicions de llavat. En la taula 11 es mostren els resultats de %R obtinguts en 3 condicions de llavat diferents, per a NIP, MIP-20 min i MIP-24h de MAA.

Taula 11. Percentatge de recuperació en realitzar l'SPE amb el NIP i els MIPs amb dos temps de contacte molècula plantilla-monòmer (MAA); l'etapa de neteja del sorbent s'ha fet amb 3 dissolucions diferents

Dissolució de neteja	% R \pm s (n=3)		
	NIP	MIP 20 min	MIP 24 h
Aigua	93 \pm 4	87 \pm 9	58 \pm 2
ACN 50%	39 \pm 3	47 \pm 9	43 \pm 9
MeOH 80%	62 \pm 6	62 \pm 20	37 \pm 8

S'observa en la figura que un major temps de contacte no millora la recuperació del diclofop-metil, donat que els %R són menors o iguals amb el *MIP-MAA-24 h* que amb el *MIP-MAA-20 min*. Amb aquest monòmer, l'augment del temps de contacte no ha afavorit la creació de llocs específics per a l'extracció, probablement a causa de la degradació del compost plantilla amb el temps.

A més, al comparar amb el NIP corresponent, podem concloure que aquests polímers MIP de MAA no milloren l'extracció de l'herbicida diclofop-metil.

6.4.2. Influència amb polímers sintetitzats amb 4-vinilpiridina

Es va preparar també un MIP de 4-VP deixant en contacte el diclofop-metil (molècula plantilla) i 4-VP durant 4 h en l'etapa de formació del complex de pre-polimerització. Posteriorment, es va estudiar el seu comportament com a sistema per a l'extracció en fase sòlida de l'herbicida diclofop metil. En la taula 12 es mostren els resultats de %R obtinguts en 2 condicions de llavat diferents emprant NIP, MIP-20 min i MIP-4h de 4-VP.

Taula 12. Percentatge de recuperació en realitzar l'SPE amb el NIP i els MIPs amb dos temps de contacte molècula plantilla-monòmer(4-VP) emprant 2 dissolucions diferents en l'etapa de neteja del sorbent

Dissolució de neteja	% R \pm s (n=2)		
	NIP	MIP 20 min	MIP 4 hores
Aigua	89 \pm 6	103 \pm 10	66 \pm 9
MeOH 20%	92 \pm 2	108 \pm 15	72 \pm 5

Igual que amb els MIPs de MAA, podem concloure que la retenció del diclofop-metil es menor en augmentar el temps de contacte en l'etapa de pre-polimerització, probablement a causa de la degradació de l'herbicida amb el temps.

D'altra banda, si comparem el *MIP-4-VP-20 min* amb el corresponent NIP de 4-VP, obtenim un %R major en el polímer d'empremta molecular tant llavant amb aigua, com amb MeOH. Per això, es conclou que, encara que el amb el NIP les recuperacions també són quantitatives, els polímers MIP amb el monòmer 4-VP presenten interaccions específiques addicionals que faran més selectiva l'extracció del diclofop-metil.

Tenint en compte aquests resultats, es va continuar l'estudi amb el *MIP-4-VP-20 min* emprant aigua en l'etapa de neteja.

6.5. Extracció d'una mescla d'herbicides amb els sorbents de 4-VP

Seguidament es va estudiar la capacitat d'extracció dels sorbents de 4-VP preparats davant d'una mescla de 5 pesticides de la família dels ariloxifenoxipropiònics: cyhalofop-butil, fenoxaprop-etil, haloxyfop-metil, propaquizafop i diclofop-metil. L'estructura química dels compostos s'ha detallat prèviament en la figura 1.

Com s'ha comentat en l'apartat de procediments experimentals, per poder analitzar les fraccions d'extracció, es va haver d'optimitzar el mètode cromatogràfic, per a establir les condicions òptimes de separació dels cinc herbicides, i va ser necessari l'ús d'un mètode de gradient. Les característiques del mètode òptim d'anàlisi s'han descrit en l'apartat 5.5.2.

Per altra banda, en el procés d'extracció en fase sòlida es va haver d'emprar acetonitril com a eluent ja que quan s'utilitzava acetona els pics dels 5 analits apareixien desdoblats.

6.5.1. Estudi de l'extracció d'una mescla patró de 5 herbicides

Es va realitzar el procediment d'SPE amb el *MIP-4-VP-20 min*, emprant una mescla patró dels cinc herbicides en concentració de 0.50 mg/L. El procediment d'SPE amb els cartutxos és el mateix que s'ha explicat en l'apartat 5.4; tots els processos es van realitzar per triplicat. En la taula 13 es mostren els resultats del %R obtingut per a cada compost de la mescla.

Taula 13. Percentatge de recuperació en realitzar l'SPE amb el *MIP-4VP-20 min* a una mescla patró dels 5 herbicides de la família del diclofop-metil.

Herbicida	% R \pm s (n=3)
Haloxypop-metil	91.2 \pm 1.8
Fenoxaprop-etil	86 \pm 7
Propaquizafop	97 \pm 6
Cyhalofop-butil	94 \pm 8
Diclofop-metil	85 \pm 7

Dels resultats de recuperació podem concloure que la recuperació dels 5 compostos és quantitativa (>85%) per a tots els compostos.

6.5.2. Estudi de l'extracció de la mescla d'herbicides en mostres reals

Finalment, es va comprovar la capacitat d'extracció del polímer seleccionat, *MIP 4-VP 20 min*, aplicant el procés d'SPE a mostres d'aigua reals additivades amb la mescla dels 5 herbicides. Aquest estudi permetrà veure la influència de la matriu de la mostra en els resultats de l'extracció. El procés d'SPE es va aplicar a dos mostres d'aigua senzilles: aigua d'aixeta d'osmosi i aigua mineral.

Es prepararen tres dissolucions de cada mostra (5 mL) additivades amb la mescla patró dels 5 pesticides (0.50 mg/L de cada compost), i es va realitzar el procés d'extracció amb els cartutxos seguint el procediment d'SPE que s'ha explicat a l'apartat 5.4.

A més, es va realitzar també el procediment d'SPE a un blanc de cada mostra: 5 mL de l'aigua problema sense additivar. L'estudi del blanc de mostra permet comprovar si la mostra presenta algun pic que interfereix amb els pics dels herbicides.

Estudi d'extracció amb la mostra d'aigua d'osmosi

L'aigua d'osmosi és una mostra senzilla, ja que la quantitat d'ions és molt baixa. Com s'observa en la taula 14, la recuperació dels 5 herbicides és bona amb el *MIP-4VP-20 min*.

Taula 14. %R en realitzar l'SPE amb el *MIP-4VP-20 min* a una mostra d'aigua d'osmosi additivada amb la mescla dels 5 herbicides.

Herbicida	% R \pm s
Haloxifop-metil	92.7 \pm 1.1
Fenoxaprop-etil	93 \pm 4
Propaquizafop	100.5 \pm 1.5
Cyhalofop-butil	94 \pm 4
Diclofop-metil	79 \pm 6

Estudi d'extracció amb la mostra d'aigua mineral

L'aigua mineral seleccionada, sent una mostra d'aigua relativament senzilla, posseeix una càrrega d'ions major que l'aigua d'osmosi, el que podria influir en l'extracció. Com s'observa en la taula 15, la recuperació després de l'extracció és quantitativa per als 5 compostos amb el *MIP-4-VP-20 min*, pel que no s'observa influència de la força iònica en el procés d'extracció dels 5 herbicides.

Taula 15. Percentatge de recuperació en realitzar l'SPE amb el *MIP-4VP-20 min* a una mostra d'aigua mineral additivada amb la mescla de 5 herbicides

Herbicida	% R \pm s (n=3)
Haloxifop-metil	101 \pm 2
Fenoxaprop-etil	94 \pm 2
Propaquizafop	110 \pm 4
Cyhalofop-butil	89 \pm 3
Diclofop-metil	88 \pm 6

7. Conclusions

En aquest treball, s'han sintetitzat polímers amb i sense empremta molecular utilitzant dos monòmers diferents, àcid metacrílic i 4-vinilpiridina. L'herbicida diclofop-metil s'ha emprat com a compost plantilla en la síntesi dels MIPs. Els polímers sintetitzats s'han utilitzat com a sorbents en l'extracció en fase sòlida de dit herbicida; l'anàlisi de les fraccions de l'extracció s'ha fet mitjançant HPLC.

En l'estudi preliminar de l'etapa d'elució d'SPE, l'acetona va resultar l'eluent més adequat en termes de recuperació, pel que s'emprà aquest eluent per a l'estudi d'extracció individual del diclofop-metil.

Respecte a l'etapa de neteja de l'SPE, els estudis realitzats permeteren traure les següents conclusions:

- L'ús de diclorometà com a dissolvent de llavat es va descartar, ja que arrossegava l'herbicida retint en el sorbent tant amb els NIPs com amb els MIPs, donant recuperacions baixes.
- En utilitzar dissolucions aquoses de diferent pH (3-9) amb els sorbents NIP, es varen obtenir recuperacions del diclofop-metil properes al 100%, per la qual cosa aquestes dissolucions no són adequades per a trencar interaccions no-específiques que tenen lloc entre el diclofop-metil i el sorbent NIP.
- Emprant com a dissolvent de llavat mesclades MeOH:aigua o ACN:aigua amb els NIPs, s'obtingueren recuperacions de diclofop-metil no quantitatives amb concentracions elevades del dissolvent orgànic: 60% MeOH amb el NIP de 4-VP, 80% MeOH amb el NIP de MAA, i 50% de ACN amb els NIPs de 4-VP i MAA.

Quant a la comparació de la capacitat d'extracció del diclofop-metil amb els polímers MIP i NIP sintetitzats, s'han extret les següents conclusions:

- Amb els polímers de MAA sols s'observen lleugeres diferències de retenció, majors amb el MIP que amb el NIP, quan s'utilitza com a dissolució de neteja ACN 50% o MeOH 100%, encara que les diferències són molt menudes i la recuperació de l'herbicida no és quantitativa en cap dels casos.
- Amb els polímers de 4VP, els millors resultats es van obtenir utilitzant aigua en l'etapa de llavat d'SPE. En aquest cas, les interaccions específiques proporcionen diferències de recuperació positives del 14% entre NIP i MIP, sent la recuperació del diclofop metil quantitativa en emprar el MIP.

D'altra banda, en l'estudi de la capacitat d'extracció dels sorbents en variar el temps de contacte herbicida-monòmer es conclou que l'augment del temps de contacte no millora la recuperació del diclofop-metil en cap cas, probablement a causa de la degradació del compost plantilla amb el temps.

Finalment, de tots els polímers sintetitzats, el *MIP-4-VP-20* min es va seleccionar per a l'estudi de mescles ja que permet extraure de forma selectiva i quantitativa al diclofop-metil quan s'empra aigua en l'etapa de neteja d'SPE gràcies a la presència d'interaccions específiques entre el sorbent i l'herbicida.

En utilitzar aquest polímer per a l'extracció en fase sòlida d'una mescla patró de cinc herbicides de la família dels ariloxifenoxipropiònics, les recuperacions dels cinc compostos van resultar quantitatives (superiors sempre al 85%), el que ens indica que el sorbent seria també selectiu per a l'extracció de compostos de la mateixa família que el compost plantilla gràcies a les interaccions generades en les cavitats específiques.

En aplicar el procés d'SPE a l'anàlisi de mostres d'aigua senzilles additivades amb la mescla dels 5 herbicides, es van obtenir també recuperacions quantitatives per als 5 compostos, el que indica que el procés d'extracció no està influït per la matriu de la mostra. Cap resaltar que en l'estudi de la mescla d'herbicides va resultar més adequat l'ús d'acetonitril com a eluent, ja que en acetona els pics dels compostos es desdoblaven.

8. Bibliografia

- [1] University of Hertfordshire. *PPDB: Pesticides Properties DataBase*. <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>> (Consulta: 18 d'abril de 2019).
- [2] European Commission. *EU Pesticides data base*. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en> (Consulta: 18 d'abril de 2019).
- [3] FMC:AN AGRICULTURAL SCIENCES COMPANY. *Productos*. <<https://fmcagro.es/producto/56/claro-sup-sup-ec>> (Consulta: 18 d'abril de 2019).
- [4] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- [5] *TP-Laboratorio químico*. <<https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/procedimientos-basicos-de-laboratorio/que-es-la-cromatografia.html>> (Consulta: 23 d'abril de 2019).
- [6] Universidad de Jaen. <http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20anàlitica%20ambiental/Tema6.pdf> (Consulta: 24 d'abril 2019).
- [7] L. Hernández Hernández i C. González Pérez, *Introducción al análisis instrumental* (2002) Editorial Ariel.
- [8] B. Valliyodan, H. Shi i H. T. Nguyen, *A Simple Analytical Method for High-Throughput Screening of Major Sugars from Soybean by Normal-Phase HPLC with Evaporative Light Scattering Detection*. *Chromatography Research International*, Article ID 757649 (2015) 8 pàgines.
- [9] P. Fernández Hernando, A. Martín Esteban, C. Pérez Conde i M. Vidal, *Toma y tratamiento de muestras* (2002) Editorial Síntesis.
- [10] Universidad Autónoma de Madrid. *Grado en Nutrición Humana y Dietética*. <http://uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/TemaJS-AISA.pdf> (Consulta: 3 de maig de 2019).
- [11] SCP SCIENCE. *Extracción en fase sòlida*. <http://www.scpscience.com/pdfs/Catalogues/Spanish/Solid_Phase_Extraction_sp.pdf> (Consulta: 3 de maig de 2019)
- [12] Teknokroma <<http://www.teknokroma.es/UserFiles/Filtracion/682.pdf>> (Consulta: 24 d'abril de 2019).
- [13] CROMLAB, *Extracción en fase sòlida*. <http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm> (Consulta: 3 de maig de 2019)
- [14] “*Un vistazo rápido a la extracción en fase sòlida (SPE)*” en Youtube <<https://www.youtube.com/watch?v=XkUsztsVaNY>> (Consulta: 3 de maig de 2019)

- [15] A. Sorribes Soriano, *Anàlisi de cocaïna en saliva mitjançant polímers de reconeixement molecular magnètics*. Projecte Final de Màster, Universitat de València (2016).
- [16] A. Speltini, a. Scalabrini, F. Maraschi, M. Sturini, A. Profumo, *Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review*, *Anal Chim Acta* 974 (2017) 1-26.
- [17] A. Martín-Esteban, *Recent molecularly imprinted polymer-based sample preparation techniques in environmental analysis*, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 9 (2016) 8-14.
- [18]. E. Herrero-Hernández, R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, *Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection*, *Anal Chim Acta* 650 (2) (2009) 195-201.
- [19] A. H. Kamel, F. T. Coelho Moreira, T. S. Ribeiro Rebelo i M. G. Ferreira Sales, *Molecularly-Imprinted Materials for Potentiometric Transduction: Application to the Antibiotic Enrofloxacin*, *Analytical Letters*, 44:12 (2011) 2107-2123.
- [20] A. Helmi Kamel, F. T. Coelho Moreira, T. S. Ribeiro Rebelo i M. G. Ferreira Sales, *Molecularly-Imprinted Materials for Potentiometric Transduction: Application to the Antibiotic Enrofloxacin*, *Analytical Letters*, 44:12 (2011) 2107-2123.
- [21] ECURED. *Extractor de Soxhlet*. <https://www.ecured.cu/Extractor_de_soxhlet> (Consulta: 15 de maig de 2019)