



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Inmovilización de nanopartículas de oro sobre barras
agitadoras como sistemas de microextracción en fase
sólida para la determinación de contaminantes
medioambientales

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

AUTOR/A: Pastillo Rodriguez, Joseph Ariel

Tutor/a: Catalá Icardo, Mónica

Cotutor/a: Gómez Benito, Carmen

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

RESUMEN

La determinación de plaguicidas en muestras medioambientales es un tema de gran importancia y, a la vez, de gran complejidad. Las bajas concentraciones que se han de detectar y la alta complejidad de las muestras, hace que se requieran técnicas analíticas de elevada sensibilidad y selectividad tales como la cromatografía. Sin embargo, incluso así, son necesarios sistemas de pretratamiento o extracción que permitan limpiar la muestra y preconcentrar el plaguicida. En este trabajo, se ha desarrollado un dispositivo de extracción por adsorción con barras agitadoras (SBSE) con esta finalidad. El dispositivo consiste en un imán recubierto de un sorbente capaz de retener de manera selectiva a los plaguicidas de interés. El sorbente desarrollado en este trabajo fue un polímero monolítico de glicidil metacrilato y etilen glicol dimetacrilato, sobre el que se inmovilizaron nanopartículas de oro. El sorbente obtenido presentó una superficie homogénea y una dureza adecuada para su empleo como SBSE. El empleo de las AuNPs confiere selectividad al sorbente hacia plaguicidas conteniendo los grupos funcionales amino, ciano y tiol. Para testar su viabilidad, se seleccionaron 4 plaguicidas con grupos ciano y tiol, obteniéndose resultados prometedores en el caso del tiacloprid y del 2-mercaptobenzotiazol.

Palabras clave: extracción por adsorción con barras agitadoras; SBSE; plaguicidas; nanopartículas de oro; polímeros monolíticos

ABSTRACT

The determination of pesticides in environmental samples is a subject of great importance and complexity, at the same time. The low concentrations that must be detected and the high complexity of the samples require highly sensitive and selective analytical techniques such as chromatography. However, additionally, pretreatment or extraction systems are necessary to clean the sample and pre-concentrate the pesticide. In this study, a Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) has been developed. This consists of a magnet coat with a suitable sorbent for the selective retention of the pesticides of interest. The sorbent developed in this study was a monolithic polymer of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate, in which gold nanoparticles were immobilized. The sorbent obtained showed a homogeneous surface and a hardness suitable for use as SBSE. The use of AuNPs confers selectivity to the sorbent towards pesticides containing the functional groups: amino, cyano and thiol. To test their viability, four pesticides with cyano and thiol groups were selected, obtaining promising results with thiacloprid and 2-mercaptobenzothiazole.

Key words: Stir bar sorptive extraction; SBSE; pesticides; gold nanoparticles; monolithic polymer.

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Problemática de la determinación de contaminantes orgánicos medioambientales.....	1
1.2. Cromatografía	2
1.2.1. Cromatografía líquida de alta eficacia.....	3
1.3. Sistemas de extracción	5
1.3.1. Técnicas de extracción tradicionales.....	5
1.3.2. Técnicas de microextracción.....	6
1.3.3. Extracción por adsorción con barras agitadoras.....	6
1.4. Polímeros monolíticos.....	9
1.5. Nanomateriales: nanopartículas de oro.....	11
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1. Instrumentos	12
3.2. Reactivos y materiales	14
3.3. Preparación de los dispositivos de SBSE.....	15
3.3.1. Hidroxilación de la superficie del imán.....	15
3.3.2. Vinilización.....	15
3.3.3. Preparación del polímero y recubrimiento del imán	16
3.3.4. Adición de las nanopartículas de oro.....	17
3.4. Procedimiento de extracción	19
4. Resultados y discusión	19
4.1. Preparación de los dispositivos de SBSE.....	19
4.1.1. Modificación de la superficie del imán.....	19
4.2. Estudio del comportamiento de los SBSE frente a diferentes compuestos....	24
4.2.1. Ciantraniliprol.....	24
4.2.2. Tiacloprid	30
4.2.3. Ditianon.....	33
4.2.4. 2-mercaptobenzotiazol	37
4. Conclusiones y futuras líneas de investigación.....	40
5. Referencia	41

1. Introducción

1.1. Problemática de la determinación de contaminantes orgánicos medioambientales

La determinación de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos, suele ser complicada dado los factores ambientales y su localización en el medio. Estos compuestos suelen encontrarse en bajas concentraciones y tienen una cierta complejidad a la hora de realizar su análisis, además, hay que añadir que generalmente se necesitan grandes cantidades de muestra para determinar estas concentraciones^[1]. Por lo tanto, la determinación de este tipo de compuestos necesita de técnicas con una elevada sensibilidad y selectividad. Una de las técnicas más factibles y fiables a la hora de realizar el análisis de estos compuestos es la cromatografía. El empleo de esta permite la separación, identificación y determinación de compuestos tanto en estado líquido como gaseoso.

Uno de los principales problemas ambientales a que la sociedad se enfrenta hoy en día, es la presencia de contaminantes orgánicos en el medio acuático. El origen de estos contaminantes proviene principalmente del uso de plaguicidas, herbicidas y fungicidas entre otros, derivados de actividades agrícolas y/o industriales.

Los contaminantes orgánicos pueden provocar daños al medio ambiente, fauna, flora y seres humanos. Algunos efectos son alteraciones de las propiedades físicas y químicas de las aguas subterráneas y superficiales, siendo las vías de contaminación principales la filtración de aguas contaminadas con estos contaminantes, escorrentía, derrames, etc. Se debe tener en cuenta, que gran parte de estos contaminantes tienen efectos tóxicos sobre los seres vivos^[2], y que en el medio ambiente se degradan con dificultad, provocando bioacumulación y biomagnificación en los seres vivos y/o en el medio.

Dentro de los insecticidas, herbicidas y fungicidas, etc, podemos encontrar diferentes familias o grupos funcionales como son, por ejemplo, los neonicotinoides, organofosforados, dinitrofenoles, diamidas, piretrinas, entre muchos otros. Son ejemplos de los diferentes grupos de compuestos orgánicos que se han utilizado en las últimas décadas en la UE (Unión Europea)^[3]. Periódicamente se revisan los efectos tóxicos de los diferentes compuestos orgánicos que se pueden encontrar en el mercado, de manera que se limita o prohíbe el uso de estos contaminantes, mediante las normativas que regulan su uso. Por contraposición, muchos de estos contaminantes prohibidos se siguen utilizando en países subdesarrollado dado su stock y la reducción en su precio de venta, lo que los hace más asequibles para este tipo de países^[4]. Esto conlleva que muchas zonas subdesarrolladas terminen contaminadas afectando no solo al medio ambiente, sino también a los seres humanos, provocando enfermedades y, en algunos casos, incluso la muerte.

Así pues, es necesario mantener la vigilancia sobre este tipo de compuestos, y para ello son necesarias herramientas de análisis potentes. Las técnicas cromatográficas, como se ha indicado, constituyen el método de referencia en la determinación de los contaminantes orgánicos en general, y de los plaguicidas en particular.

1.2. Cromatografía

La cromatografía permite separar, identificar y cuantificar los diferentes componentes de una muestra. Para realizar esta separación, ocurren dos procesos diferentes:

- El primero sería el transporte de la muestra producido en la fase móvil.
- El segundo sería la retención o ralentización del arrastre del analito de la muestra en la fase estacionaria. Esto ocurre porque la fase estacionaria debe tener una mayor afinidad con el analito o analitos que la fase móvil.

De esta manera, en función de la diferente velocidad de migración de los componentes de la muestra (en función de su grado de retención) al atravesar la fase estacionaria, se producirá la separación de los compuestos de interés y de los posibles interferente^[5].

Existen diferentes tipos de cromatografía, que se pueden clasificar según el estado físico de la fase móvil, según el mecanismo de separación o según el tipo de lecho cromatográfico. Esta variedad cromatográfica permite a los usuarios seleccionar las técnicas que se adapten mejor a los requerimientos del análisis. Algunos de los tipos de cromatografía que, atendiendo a los criterios mencionados, se pueden destacar son:

- Estado físico de la fase móvil: Cromatografía de gases (GC); Cromatografía de líquidos (LC); Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) ^[6]
- Mecanismos de separación: Cromatografía de adsorción; Cromatografía de intercambio iónico; Cromatografía de exclusión; Cromatografía de afinidad ^[7]
- Según el tipo de lecho cromatográfico: Cromatografía en columna; Cromatografía plana ^[8]

La cromatografía en columna es la más común actualmente. En este caso, hay una serie de características que se deben de cumplir a la hora de realizar la separación cromatográfica:

- La fase estacionaria y la fase móvil deben ser inmiscibles.
- Para el transporte en la fase móvil, los solutos deben ser solubles en esta y tener una polaridad similar. La muestra será inyectada en la fase móvil, de manera que esta, la transporta hacia la fase estacionaria. Antes de entrar a la fase estacionaria, la muestra se moverá a la misma velocidad que la fase móvil.

- Los solutos al atravesar la columna deben de tener migración diferencial, esto es necesario para que no se solapen a la hora de realizar el análisis.
- Los solutos deben tener la habilidad de entrar y salir de la columna, es decir, se debe de cumplir el principio de propagación.

Para este estudio se ha seleccionado la cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (del inglés, high performance liquid chromatography), acoplada a un detector de fila de diodos.

1.2.1. Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC es un tipo de cromatografía en columna, lo que hace referencia a que la fase estacionaria, es decir, el lecho estacionario o sorbente, se coloca dentro de una columna, normalmente de acero, vidrio u otros materiales similares, que no interfieran en el proceso de análisis.

La principal diferencia entre la cromatografía en columna convencional y HPLC es que la columna empleada en esta última se rellena con partículas de tamaño mucho más pequeño, de sólo unos pocos μm , de manera que el número de interacciones de la muestra con el relleno se multiplica ampliamente con respecto de las columnas convencionales. Por lo tanto, los procesos de separación son mucho más eficaces. En contraposición, para hacer avanzar la fase móvil por la columna se debe bombear a altas presiones a través de la fase estacionaria que se encuentra dentro de la columna lo que hace al instrumento mucho más complejo. Este menor tamaño de partícula otorga una serie de ventajas como es la disminución del tiempo de trabajo, la reducción de la difusión de los analitos en la fase estacionaria, proporcionando unos resultados más exactos.

Por lo tanto, la muestra es transportada en la fase móvil a una velocidad determinada, y al entrar en contacto con la fase estacionaria, el analito se ralentiza, de manera que los elementos restantes de la muestra atraviesan la fase estacionaria a la misma velocidad que la fase móvil, dando lugar a que el analito de la muestra se concentre en el lecho cromatográfico. Transcurrido un tiempo, se obtiene la separación del analito del resto de compuestos de la muestra en el lecho cromatográfico y es posible cuantificarla a través de la señal del detector conectado al cromatógrafo.

En la imagen 1 se observa un esquema conceptual de las diferentes partes de un equipo de HPLC^[9]:

- Depósito de fase móvil: se trata de un depósito dónde se almacenan los diferentes disolventes se utilizarán como fase móvil.

- Bomba de impulsión: la bomba se encarga de succionar la fase móvil e impulsarla hacia la columna dónde se encuentra la fase estacionaria. Esta bomba es necesaria para hacer fluir la fase móvil por todo el circuito a una velocidad constante.
- Inyector: se trata de un sistema de inyección automatizado o manual que permite tomar volúmenes de muestra de manera exacta y reproducible e inyectarlos en la fase móvil.
- Columna: contiene la fase estacionaria. Dependiendo del material de relleno, el tamaño de partícula, la longitud etc. pueden variar, y con ello la velocidad, eficiencia, vida útil, etc. La columna es un elemento clave que requiere de mantenerla en perfecto estado para obtener resultados con mayor precisión. Para proteger la columna, se emplean a menudo precolumnas.
- Detector: todos los sistemas de HPLC tienen un sistema de detección, que permite detectar los cambios en la composición de los efluentes de la columna y convertirlas en la señal del analito, y traducir estos cambios de señal en valores numéricos.
- Datos: los datos son enviados a un ordenador con un software específico que permite controlar los diferentes módulos descritos, así como trabajar con los datos obtenidos.

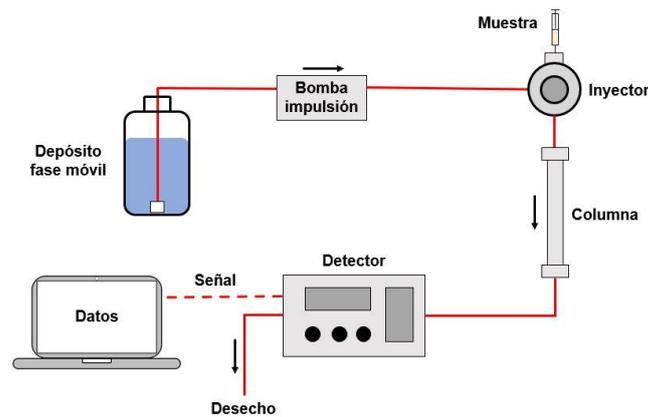


Imagen 1. Esquema conceptual de la cromatografía líquida de alta eficacia^[9]

A pesar de la elevada sensibilidad y selectividad de las técnicas cromatográficas para llevar a cabo la determinación de compuestos orgánicos, cuando se quieren aplicar a muestras complejas como lo son las muestras medioambientales, suele ser necesaria una etapa previa de pretratamiento o extracción, por una parte, para limpiar la muestra eliminando potenciales interferentes y, por otra, para preconcentrar el compuesto de interés o analito, dadas las bajas concentraciones a determinar.

1.3. Sistemas de extracción

Los principales objetivos de las técnicas de extracción son^[10].

- Separar el o los analitos del resto de la matriz de muestra.
- Preconcentrar estos analitos, para que puedan ser cuantificables mediante el proceso cromatográfico.
- Adecuar el disolvente en el que se encuentra la muestra para que se pueda aplicar el método cromatográfico previsto.

1.3.1. Técnicas de extracción tradicionales

Las dos técnicas de extracción tradicional más utilizadas son la “Extracción líquido-líquido” o LLE (del inglés liquid-liquid Extraction) y la “Extracción en fase sólida”, o SPE (del inglés, solid-phase extraction).

La extracción líquido-líquido o LLE, consiste en que el analito se transfiera de un disolvente a otro inmiscible con una mayor afinidad. Los principales inconvenientes que se encuentra en este tipo de técnica, es que el tiempo de extracción es sumamente elevado, requiere grandes cantidades de volumen de muestra y de disolventes orgánicos, que normalmente son tóxicos.

La extracción en fase sólida o SPE, se realiza mediante un sorbente sólido que se encuentra dentro de unos cartuchos de extracción. La muestra se pasa por estos cartuchos y el analito queda retenido en este material sorbente. Seguidamente se realiza una fase de elución, dónde se utiliza un disolvente orgánico con una gran afinidad con el analito, el cual se hace pasar por los cartuchos y se recoge el disolvente con el analito. Un inconveniente por considerar es que los sorbentes muchas veces presentan efectos de memoria que provocan una baja reproductibilidad.^{[10][11]}

Las técnicas de extracción actualmente presentan una línea de investigación bastante amplia, y en particular, en los últimos años, han ido ganando terreno las técnicas de microextracción, que además forman parte de la tendencia hacia una “química verde”. Este tipo de técnica presenta una serie de ventajas sobre las técnicas clásicas de extracción y preconcentración, entre las que destaca la disminución del empleo de disolvente orgánico durante todo el proceso de análisis. Por otra parte, también se reduce el tiempo empleado para realizar todo el proceso en comparación con otro tipo de técnicas similares, y, por último, las técnicas de microextracción permiten preconcentrar contaminantes orgánicos en muestras ambientales líquidas con una gran eficacia.^[12]

1.3.2. Técnicas de microextracción

Dos de las técnicas de microextracción más utilizadas hoy en día son la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción por adsorción con barras agitadoras (SBSE por sus siglas en inglés, Stir bar Sorptive Extraction)^[13]. La microextracción en fase sólida se basa en la adsorción del analito o analitos de la muestra mediante una fibra recubierta con un polímero o adsorbente, o en algunos casos se utiliza una mezcla de estos dos. La fibra se encuentra dentro de un soporte similar a una aguja quirúrgica, la cual se pone en contacto directo con la muestra. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se retira la fibra y se utilizan disolventes para la desorción del analito en una fase líquida.^[14]

En el presente trabajo, se desarrollará un sistema de SBSE, por lo que se comentará más detalladamente su funcionamiento en el siguiente apartado.

1.3.3. Extracción por adsorción con barras agitadoras.

La extracción por adsorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE) emplea imanes recubiertos de una fina capa de material sorbente, normalmente un polímero, con gran afinidad por el analito/s de interés, de modo que sea capaz de retenerlo por adsorción.

Para este tipo de técnica, se sumerge la barra recubierta del sorbente en un volumen de muestra, donde se quiere determinar uno o varios analitos. Se coloca el recipiente que lo contiene en un agitador magnético a una velocidad y tiempo determinado. Estos factores vendrán dados por el tipo de analito que se quiera adsorber y el polímero empleado, entre otros factores.

Una vez ha transcurrido este tiempo, idealmente el sorbente que recubre los imanes o barras agitadoras ha adsorbido todo el analito de la muestra. Finalizado este proceso, se realiza un proceso de elución, en el cuál, es necesario utilizar un disolvente adecuado para que se produzca la desorción del analito retenido en el sorbente.

En las imágenes del 2 al 5 se muestran las diferentes etapas que comprende el empleo de estos dispositivos para llevar a cabo el proceso de extracción^[10].

- Etapa 1 o acondicionamiento: como se muestra en la imagen 2, la barra agitadora es sumergida en uno o varios disolventes sucesivamente, con el fin de extraer cualquier impureza que pueda contener y finalmente se limpia con agua para eliminar los restos de disolventes. Se deja así en el medio en que estará la muestra.

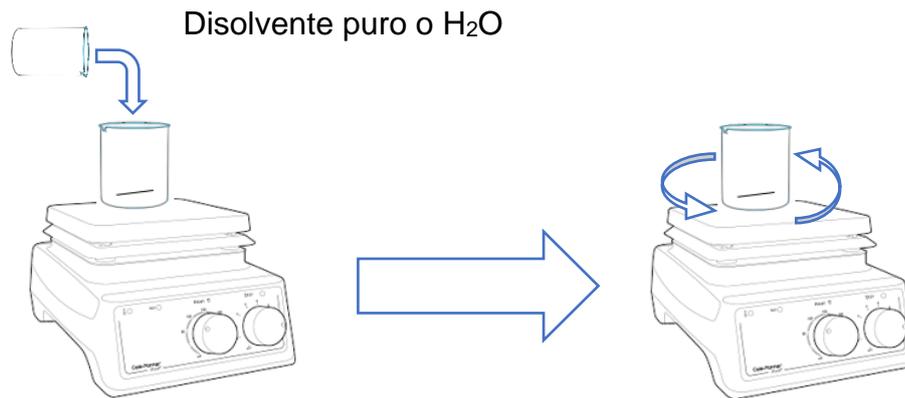


Imagen 2. Proceso de acondicionamiento

- Etapa 2 o carga: a continuación, el imán se sumerge en un volumen de muestra y con ayuda del agitador magnético, se hace girar a una velocidad y tiempo determinado para adsorber el analito de la muestra. Durante este proceso, la barra agitadora debe adsorber el analito de manera selectiva frente a los otros compuestos presentes en la muestra. Normalmente quedan también absorbidos otros compuestos que no interesan, como se muestra en la imagen 3.

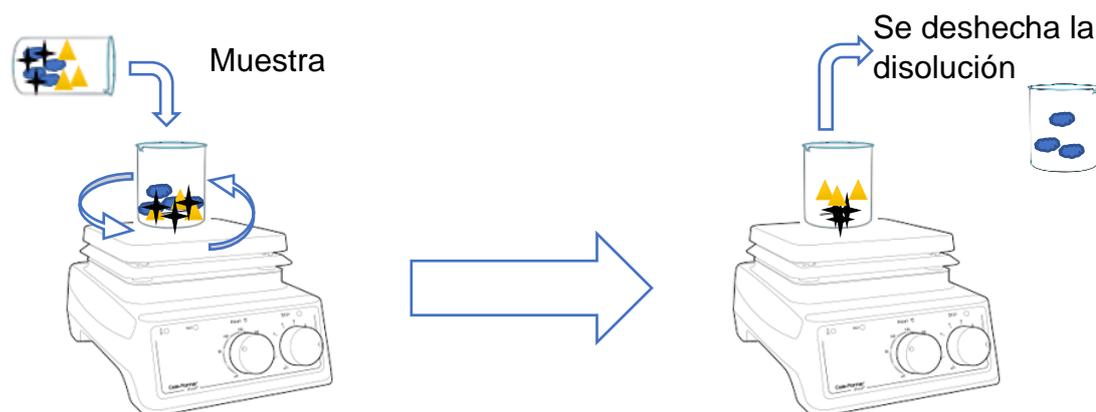


Imagen 3. Proceso de carga. Dónde: ● ; ▲ ; ✦ son las diferentes sustancias que se encuentran una muestra hipotética, en este caso, ✦ es el analito que se quiere determinar.

- Etapa 3 o lavado: una vez finalizada la etapa 2, la disolución es desechada y el imán es sumergido en un disolvente que permita limpiar el imán sin provocar la desorción de los analitos (ver imagen 4), con el fin de eliminar otros compuestos presentes en la muestra que puedan haber quedado parcialmente retenidos, pero que no son de interés para nuestro análisis.

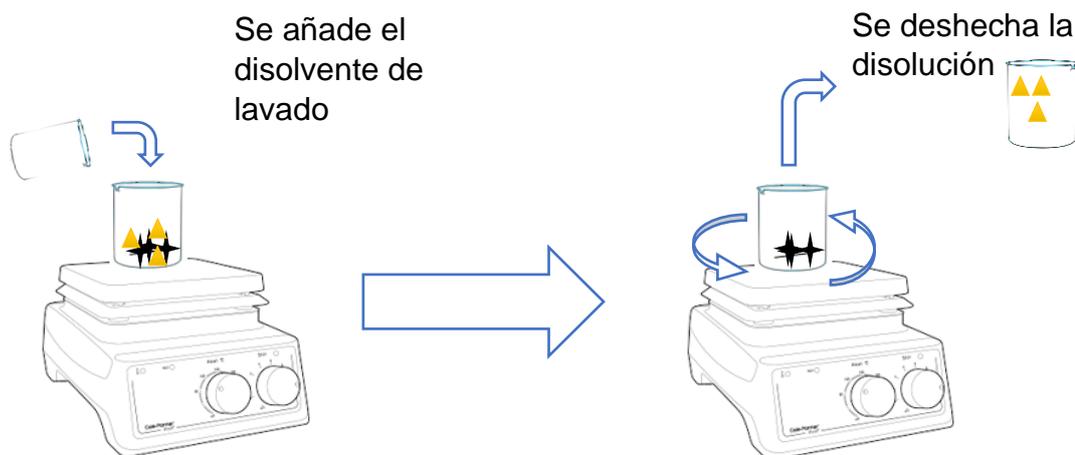


Imagen 4. Proceso de lavado

- Etapa 4 o elución: la barra agitadora se sumerge a continuación en un disolvente adecuado para eluir o desorber el analito, como se muestra en la imagen 5, de manera que se obtiene por una parte el imán limpio, y por otra una disolución que contiene al analito. Si el volumen de elución es menor que el de muestra, además de la limpieza de la disolución se logra la preconcentración del analito.

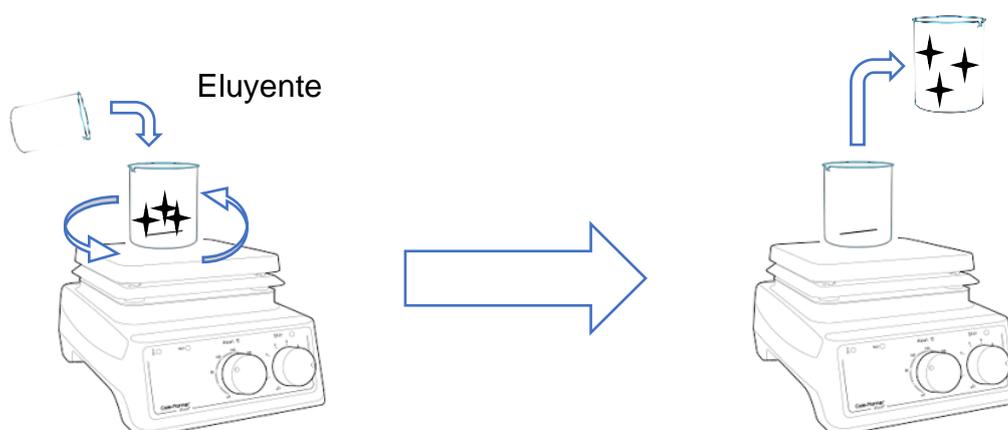


Imagen 5. Proceso de elución

El dispositivo de SBSE más común se compone de una película de polidimetilsiloxano (PDMS), recubierta sobre una cubierta de vidrio con un núcleo magnético incorporado [15]. Junto al PDMS, el empleo de polietilenglicol (PEG) y poliacrilato (PA) son los más habituales ya que son los disponibles comercialmente. Sin embargo, el interés que estos dispositivos ha despertado ha llevado a que muchos autores centren su investigación en el desarrollo de otros sorbentes poliméricos y sistemas de SBSE buscando en ellos una mayor estabilidad térmica y química y perfiles de selectividad más amplios. Por supuesto, dado que el polímero ha de adsorber al analito/s, es necesario que tenga una gran afinidad por el mismo.

1.4. Polímeros monolíticos

Hoy en día, las nuevas investigaciones, así como las marcas comerciales de sistemas de extracción y microextracción, presentan una amplia variedad de polímeros orgánicos e inorgánicos que actúan como sorbente en este tipo de sistemas.

Los polímeros monolíticos constituyen un material continuo poroso, generalmente creado por la polimerización in situ de monómeros. Su preparación puede llevarse a cabo en el laboratorio fácilmente. Para ello se prepara una mezcla de polimerización, constituida por monómeros, entre los que se encuentra un agente entrelazante o crosslinker, una mezcla porogénica de disolventes y un iniciador radicalario para que tenga lugar la reacción. Variando la composición de la mezcla anterior, es posible controlar las propiedades del monolito resultante, en cuanto a porosidad y área superficial. [16][17]

El mecanismo de polimerización es radicalario. Esto quiere decir, que la formación del polímero se basa en la adición sucesiva de monómeros provocado por la reactividad de los radicales libres. Para obtener el radical libre que iniciará el proceso, se pueden seguir diferentes estrategias: por calentamiento, mediante la acción de iniciadores químicos o mediante radiación UV. La iniciación térmica es la más habitual.

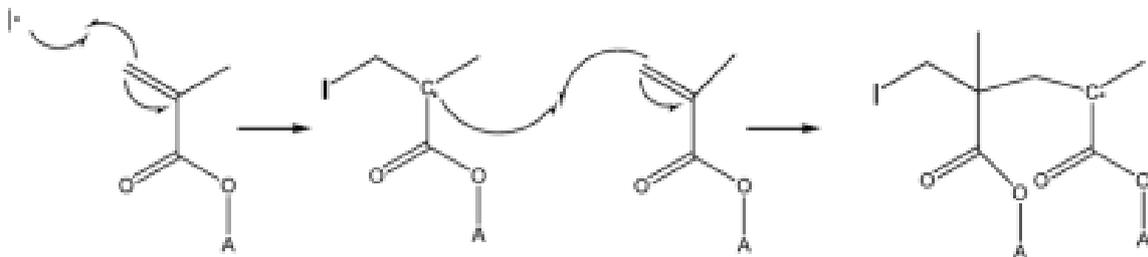


Imagen 6. Primeras etapas del mecanismo de polimerización. Dónde “I·” hace referencia al radical generado a partir del iniciador, “A” es un grupo terminal que depende del monómero empleado y “C·” es un monómero generando un nuevo radical.

En la imagen 6, se muestran las primeras etapas de la reacción de polimerización. Como se observa, una vez generado radical libre (“I·”), este ataca el doble enlace terminal del monómero generando un nuevo radical (“C·”), repitiéndose el proceso continuamente provocando un crecimiento de la cadena polimérica. Este proceso es conocido como “propagación”.

Al mismo tiempo, el monómero reacciona con el agente entrelazante o “crosslinker”. Esta unión es provocada porque el agente entrelazante contiene dos o más grupos

reactivos (dobles enlaces) que actúan como puente de unión de las diferentes cadenas de monómeros. En la imagen 7 se muestra el proceso de polimerización empleando etilen glicol dimetacrilato (EDMA) como agente entrelazante o crosslinker. A medida que aumenta el tamaño de la cadena, la solubilidad del medio disminuye, y, por otra parte, los núcleos generados se van separando.

La última etapa o “terminación” ocurre cuando finaliza el crecimiento de las cadenas. Esto es provocado cuando reaccionan dos radicales poliméricos.^{[18][19]}

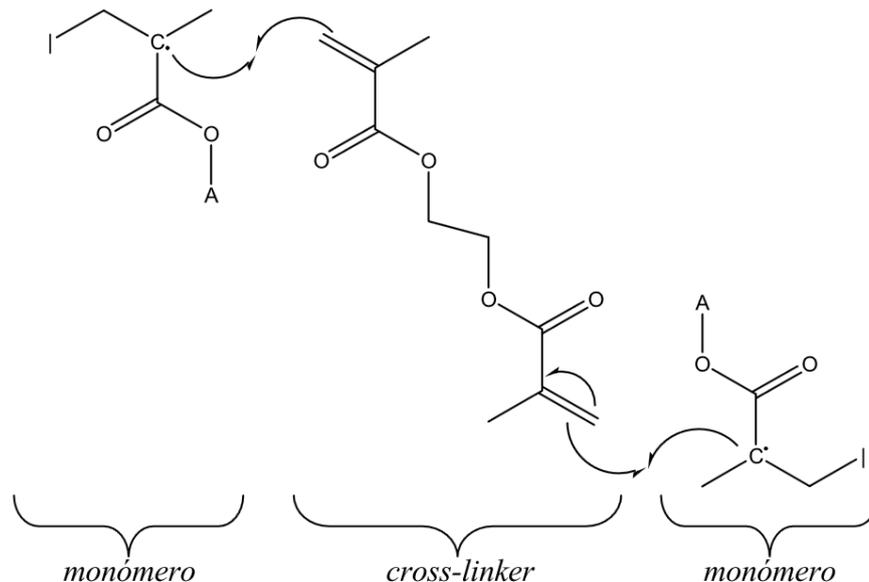


Imagen 7. Proceso de polimerización con EDMA como crosslinker

Al final del proceso, se obtiene un sólido monolítico de color blanco, y un líquido porogénico que rellena los poros de la estructura. Esto se debe a que hay monómeros que no reacciona, solvatando los núcleos, de manera que hacen crecer la concentración de estos, formando microglóbulos.^{[19] [20]}

Los polímeros monolíticos obtenidas a partir de monómeros de metacrilato presentan muchas ventajas frente a otros sorbentes, ya que presentan una gran estabilidad frente a un amplio rango de pH (1-14) y su síntesis es rápida y sencilla ^[21]. Además, si se utiliza glicidil metarilato (GMA) como monómero base, el monolito puede derivatizarse fácilmente debido a la gran reactividad del grupo epoxi que presenta en su estructura. Esta modificación del polímero obtenido permite incrementar su selectividad hacia el analito/s de interés.

1.5. Nanomateriales: nanopartículas de oro

Hoy en día, los nanomateriales presentan un gran interés en investigación en una gran variedad de ámbitos, tales como salud, electrónica, protección del medio ambiente, entre otros.

Las nanopartículas de oro han sido una fuente de investigación importante en las últimas décadas, lo que ha permitido conocer diferentes características como una baja toxicidad, estabilidad química, propiedades fototérmicas, etc.

En este estudio, se ha propuesto la utilización de nanopartículas de oro (AuNPs) para la modificación del polímero monolítico empleado como sorbente sobre la barra agitadora. Esta modificación mejorará previsiblemente la selectividad de la absorción de compuestos que contengan los grupos funcionales “tiol” (-SH), “ciano” (-C≡N) y “amino” (-NH₂), por los que el oro tiene gran afinidad.^[22]

2. Objetivos

El objetivo principal del presente estudio es conseguir preparar un nuevo sistema de extracción por absorción con barras agitadoras (SBSE), basado en el empleo de polímeros monolíticos orgánicos, modificados con nanopartículas de oro (AuNPs), y la realización de un estudio de su viabilidad como sistema de limpieza y preconcentración selectiva de plaguicidas conteniendo los grupos funcionales tiol y/o ciano, en muestras acuosas.

Para ello, el estudio constará de dos etapas:

- La primera etapa es la preparación del dispositivo SBSE partiendo de un imán comercial de 1.5 x 1 mm recubierto de politetrafluoroetileno (PTFE). Mediante el tratamiento adecuado, el imán se recubrirá de un sorbente polimérico de glicidil metacrilato (GMA) y etilen glicol dimetacrilato (EDMA). La composición de la mezcla será optimizada para proporcionar las propiedades físico-químicas adecuadas. Los imanes se modificarán con AuNPs.
- La segunda etapa, consistirá en testar las barras agitadoras preparadas con diversos plaguicidas conteniendo los grupos tiol o ciano, dada la afinidad de las AuNPs por estos grupos funcionales, y determinar así la viabilidad de los dispositivos desarrollados como sistemas de extracción de los plaguicidas en presentes en muestras acuosas medioambientales, tales como aguas de riego, ríos, océanos, etc. muestras de gran complejidad y en las que los plaguicidas pueden estar presentes en bajas concentraciones. Para poder realizar la evaluación del funcionamiento como SBSE, se empleará un equipo de HPLC que permitirá determinar la concentración de los contaminantes retenidas y eluidas.

3. Materiales y métodos

3.1. Instrumentos

- Cromatógrafo

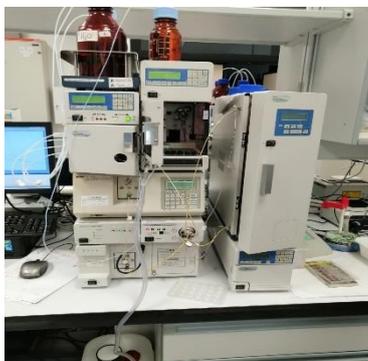


Imagen 8. Cromatógrafo HPLC empleado durante el estudio

EL cromatógrafo HPLC utilizado para realizar el análisis es de la marca Jasco y está compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba de pistones PU-2089.
- Automuestreador AS-2055/2057.
- Horno de columna CO-2065.
- Detector de fila de fotodiodos MD-2018.
- El sistema se controla mediante la interfaz de LC-NETII / AFC también suministrada por Jasco y la adquisición de datos y el tratamiento se realizó utilizando el software ChromNAV (versión 1.17.01).

La columna cromatográfica empleada fue una Eclipse plus C18 de 4.6x100 mm de 3.5 μm de la casa comercial ZORBAX.

- Sistema de purificación de agua



Imagen 9. Sistema de purificación de H₂O

El agua empleada en todas las experiencias se obtuvo mediante un sistema de purificación Puranity TU 3/6, de la marca VWR, provisto de un filtro de 0.2 µm.

- Cámara de nitrógeno

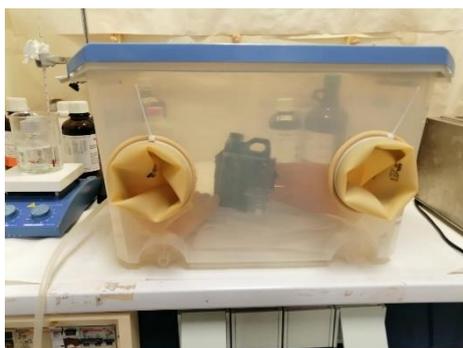


Imagen 10. Cámara de nitrógeno

La cámara de nitrógeno es empleada para realizar el tratamiento con FluoroEtch®. Para ello, la cámara se llena de nitrógeno expulsando el aire de su interior y creando una atmósfera inerte que no reaccione con el FluoroEtch®, para impedir que se estropee o que algún compuesto que este en el aire reaccione con este provocando algún tipo de daño.

- Otros instrumentos empleados: cronómetros, pH-metro, agitadores con/sin calefactor, baño de agua, baño de ultrasonidos, estufa, etc.

3.2. Reactivos y materiales

Para la preparación de las barras agitadoras (SBSE), se han utilizado los siguientes reactivos y materiales:

- Glicidil metacrilato (GMA) de la casa comercial SigmaAldrich
- Etilen glicol dimetacrilato (EDMA) de la casa comercial SigmaAldrich
- Cyclohexanol de la casa comercial Alfa Aesar
- 1-dodecanol de la casa comercial Alfa Aesar
- Azobisisobutironitrilo (AIBN) de la casa comercial Fluka
- Peróxido de lauroil (LPO) de la casa comercial Alfa Aesar
- Trietilamina (TEA) de la casa comercial Alfa Aesar
- Dimetilformamida (DMF) de VWR Chemicals
- Nanopartículas de oro, 20 nm en 0,1 mg/L de citrato sódico de Alfa Aesar
- FEP, tubo de etileno propileno fluorado con diámetro interno de 3,6 mm y 6 mm de externo de la casa comercial Bohlender GmbH
- Los imanes empleados para este estudio fueron de 15 mm de longitud y 1,5 mm de diámetro, y estaban recubiertos de politetrafluoroetileno. Se adquirieron a la casa comercial VWR Chemicals. Como se observa en la imagen 11 son de color blanco.



Imagen 11. imán de politetrafluoroetileno

Los plaguicidas seleccionados para testar los sistemas de SBSE desarrollados fueron de la casa comercial SigmaAldrich;

- Ciantraniliprol (CYN)
- Tiacloprid
- Ditianon
- 2-mercptobenzotiazol (MBT)

Para la preparación de los patrones de plaguicidas, se pesó en balanza analítica la cantidad de sólido necesaria para obtener una disolución de 1000 ppm en ACN. Estas disoluciones se conservaron en viales de topacio en una nevera para preservarlas.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico, excepto el acetonitrilo (ACN) (adquirido a VWR) y el metanol (Panreac), que fueron de calidad HPLC.

3.3. Preparación de los dispositivos de SBSE

Para la preparación de los imanes, el primer paso que ha de realizar es el lavado los imanes. Para ello se sumergen en etanol y se mantienen en agitación a 400 rpm durante unos 5-10 minutos. A continuación, se repite el proceso empleando acetona, y finalmente se secan en estufa.

Una vez limpios, se procede a modificar su superficie por hidroxilación y posterior vinilización, antes de recubrirlo con el polímero adecuado, y finalmente se procede a la inmovilización de las AuNPs. A continuación, se detalla el procedimiento seleccionado.

3.3.1. Hidroxilación de la superficie del imán

Para la modificación de la superficie del imán se tratan con 12 mL del reactivo comercial FluoroEtch® a 60°C durante 30 min. El tratamiento y manipulación del reactivo se debe realizar en un ambiente exento de humedad y oxígeno para evitar su degradación. Durante la investigación se ha realizado este proceso en una cámara de nitrógeno preparada en el laboratorio, pero se podrían utilizar otros gases inertes.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se lavan los imanes con metanol, seguido de un lavado con agua a 60-70°C y finalmente con una disolución acuosa de ácido acético al 1% a 60-70°C. Una vez terminado el proceso se secan los imanes a 70°C en la estufa. Los imanes resultantes presentan un color negro como se muestra en la imagen 12.



Imagen 12. Imanes después de ser modificada con FluoroEtch® su superficie.

3.3.2. Vinilización

Para el proceso de vinilización, los imanes se introducen durante 2 h a 60°C en una disolución a pH 8 de GMA 2 M en dimetilformamida (DMF) conteniendo trietilamina (TEA) 5 mM, tal y como se muestra en la imagen 13.

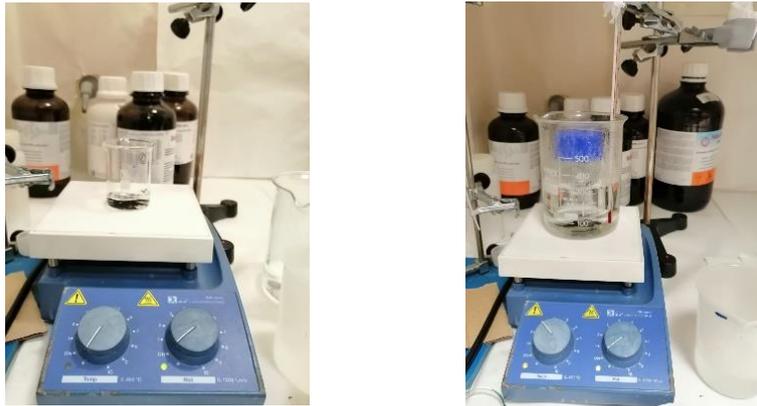


Imagen 13. Procedimiento de vinilización

3.3.3. Preparación del polímero y recubrimiento del imán

Para realizar el recubrimiento del imán con el polímero, el primer paso es preparar la mezcla de polimerización, cuya composición se muestra en la Tabla 1.

Mezcla de polimerización	
Compuesto	% peso
GMA	32
EDMA	8
Cyclohexanol	52
1-dodecanol	8
AIBN	1*

* %respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 1. Composición de la mezcla de polimerización de la mezcla

La mezcla de polimerización se introduce durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos para homogeneizarla y a continuación se burbujea nitrógeno a su través durante 10 minutos para eliminar el O₂ disuelto. Esto es necesario para minimizar la formación de burbujas, ya que se quiere obtener una capa de polímero lo más homogénea y lisa posible.

A continuación, se introduce el imán en posición vertical en el interior de un molde consistente en un tubo de FEP (etileno propileno fluorado) de 3.6 mm de diámetro, sellado térmicamente por uno de los extremos, y se llena el tubo con la mezcla de polimerización hasta que el imán queda completamente cubierto. Para mantener el imán centrado, se emplean dos protectores de plástico, tal y como se muestra en la Imagen 14. De este modo, cuando se forme el polímero, quedará una capa homogénea de 1 mm de sorbente entorno a toda la superficie del imán.



Imagen 14. Imán colocado en el molde con el polímero

Seguidamente, se introduce el soporte con el imán en una estufa a 60°C durante 5h. Transcurrido el tiempo, los imanes se desmoldan, presentando el aspecto mostrado en la imagen 15 A y se les pone unas mancuernas de polipropileno (Imagen 15 B), obtenidas fundiendo puntas de pipeta.

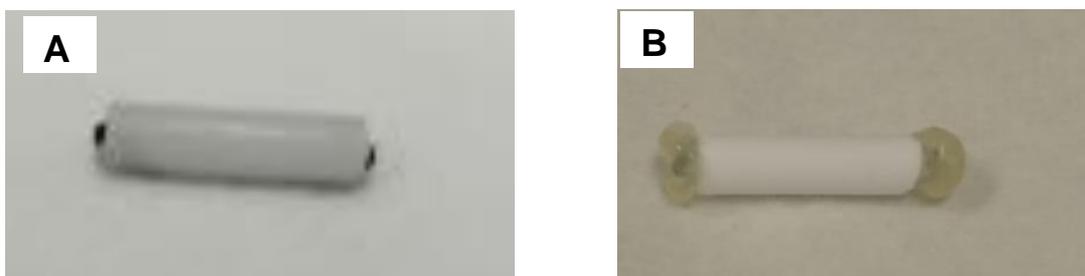


Imagen 15 A. Imán desmoldado recubierto del polímero. 15 B. Imán con las mancuernas de polipropileno.

Para finalizar, se sumergen en metanol durante 24 horas en agitación constante, renovando el metanol periódicamente, para eliminar los disolventes porogénicos y los restos de monómeros que no hayan reaccionado.

3.3.4. Adición de las nanopartículas de oro

Para realizar este proceso se sumergen los imanes en 20 mL de NH_3 4,5 M durante 2 horas a 60°C^[23]. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se debe de lavar con agua hasta conseguir que los imanes estén a pH neutro.

Una vez conseguido, se retira el agua y se adicionan las nanopartículas de oro (AuNPs) por un total de 15 días, manteniendo los imanes en agitación a 200 rpm.

Como se observa en la Imagen 16, el color rojo de la disolución de AuNPs claramente va desapareciendo conforme transcurre el tiempo, a la vez que el imán va adquiriendo una tonalidad rojiza, lo que confirma que se está produciendo la inmovilización de las AuNPs en la superficie del polímero. Cuando el color rojo de la disolución era casi inapreciable, se retiraba el líquido y se reponía un nuevo volumen de AuNPs. Una vez transcurrido este tiempo, se debe lavar con citrato sódico 38.8 mM a pH 6.6.

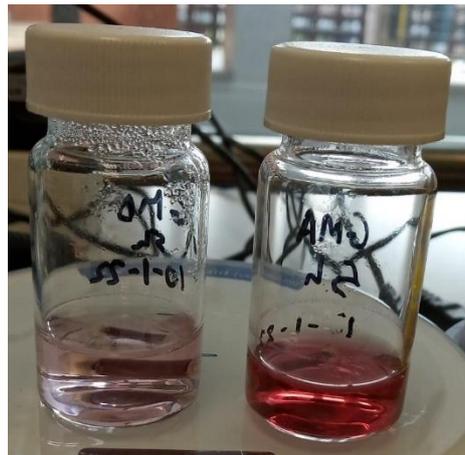


Imagen 16. Imanes sumergidos en la disolución de nanopartículas de oro antes (derecha) y después (izquierda) de la inmovilización de las AuNPs sobre la superficie del polímero.

En la imagen 17, se muestra el dispositivo de SBSE obtenido al finalizar el proceso, donde se pueden observar las mancuernas de polipropileno y el polímero modificado con las AuNPs de color rojo-rosado oscuro.

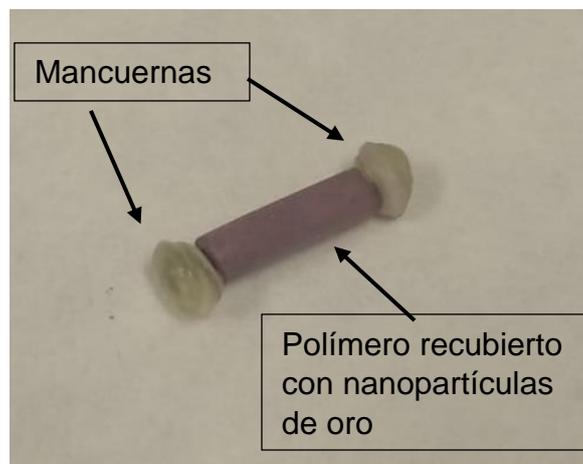


Imagen 17. SBSE resultantes

3.4. Procedimiento de extracción

Para la del proceso de extracción se siguieron los siguientes pasos:

- Etapa 1 o acondicionamiento: Se sumerge el imán en 3 mL de metanol durante 10 minutos a 400 rpm. Se repite este paso con 3 mL de ACN durante 10 minutos a 400 rpm y finalmente con 5 mL de H₂O en las mismas condiciones.
- Etapa 2 o carga: Se introduce el imán en 5 ml de muestra que contiene el analito a 400 rpm durante 90 minutos.
- Etapa 3 o lavado: En el caso de nuestro estudio, esta tercera fase se eliminó, ya que se trabajó con patrones de los plaguicidas en agua ultrapura.
- Etapa 4 o elución: En esta fase, se añade un extractante adecuado para el analito en estudio. Para ello, se emplean 3 mL de ACN a 400 rpm durante 30 minutos, excepto en el caso del MBT, para el que se utiliza ácido tioglicólico (ATG) 500 mM.

4. Resultados y discusión

4.1. Preparación de los dispositivos de SBSE

4.1.1. Modificación de la superficie del imán

Como se ha comentado en la introducción, la mayoría de los sistemas de SBSE propuestos emplean un núcleo magnético recubierto de vidrio como núcleo al que anclar el sorbente. Esto es debido a la facilidad que presenta el vidrio para ser vinilizado, lo que facilita el anclaje del polímero. Sin embargo, el empleo de vidrio confiere fragilidad al sistema. Por ello, en nuestro caso decidimos emplear imanes comerciales recubiertos de politetrafluoroetileno (PTFE).

Dada la inercia química del PTFE, su modificación y anclaje del polímero encierra cierta dificultad. Para ello, se llevó a cabo un tratamiento con FluoroEtch®, tal y como se ha descrito en la sección anterior, lo que permitió la formación de grupos hidroxilo (-OH), entre otros, sobre la superficie del imán (primera etapa de la Imagen 18)^[24]. En la etapa de vinilización estos grupos hidroxilo, se hacen reaccionar a continuación con el grupo epoxi del GMA, empleando trietilamina (TEA) como catalizador (ver la segunda etapa de la Imagen 18). De este modo se introducen dobles enlaces en la superficie del imán, que durante el proceso de polimerización podrán reaccionar para integrarse en la red polimérica, quedando de ese modo el polímero anclado al imán mediante enlaces covalentes.

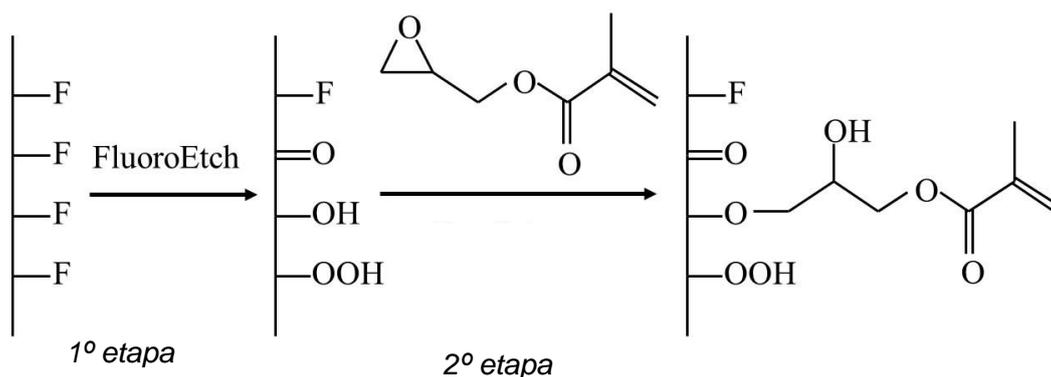


Imagen 18. Proceso de modificación de la superficie de PTFE.

4.1.2. Selección del polímero

La selección de la mezcla de polimerización es de especial relevancia para obtener un SBSE con las características adecuadas para poder ser empleado como sistema de extracción. El monolito obtenido debe presentar una alta porosidad, pero también una elevada resistencia mecánica, de modo que soporte, sin sufrir deterioro alguno, las largas horas de agitación. Basándonos en una revisión bibliográfica y en la experiencia previa del grupo de investigación, se seleccionó un polímero de GMA (monómero) y EDMA (agente entrelazante o crosslinker), empleando como disolventes porogénicos cyclohexanol y 1-dodecanol y, como iniciador térmico, AIBN o Peróxido de lauroil (LPO). Sin embargo, la proporción de estos componentes en la mezcla de polimerización es clave para obtener un monolito con las propiedades indicadas, por lo que se realizó un estudio conducente a la selección de la mezcla óptima.

- Mezcla 1 de polimerización

La primera mezcla en estudio se basó en un trabajo de I. Ten-Doménech y col^[25] con algunas modificaciones. Esta mezcla contenía un 25% de monómeros y un 75% de disolventes porogénicos. Esta elevada proporción de disolventes se seleccionó buscando un polímero con una elevada porosidad que facilitara la penetración de los analitos y, por tanto, la adsorción de estos. La composición de la mezcla se muestra en la Tabla 2.

Mezcla de polimerización 1	
Compuesto	% peso
GMA	20
EDMA	5
Cyclohexanol	70
1-dodecanol	5
AIBN	1*

*%respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 2. Composición del polímero 1

Una vez relleno el molde, con el imán y la mezcla indicada, tal y como se ha descrito en la sección 3.3.3, se introdujo este en una estufa a 60°C durante 24 horas.

El SBSE obtenido fue demasiado blando y propició el desprendimiento total o parcial del polímero con su uso, por lo que fue descartado.

- Mezcla 2 de polimerización

Con el fin de incrementar la dureza del polímero, se seleccionó una mezcla basada en el trabajo de B. Fresco-Cala y col^[26], en la que el contenido de monómeros totales se incrementa hasta el 50%, manteniendo constante la relación GMA:EDMA. La composición de esta nueva mezcla se muestra en la Tabla.

Mezcla de polimerización 2	
Compuesto	% peso
GMA	40
EDMA	10
Cyclohexanol	46.4
1-dodecanol	3.6
LPO	0.3*

*%respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 3. Composición del polímero 2

La polimerización térmica se llevó a cabo a 70°C durante 24 horas. La dureza del polímero obtenido fue elevada, proporcionando un SBSE robusto que no se dañó durante el proceso de agitación. Sin embargo, al modificar el imán con las AuNPs, no

se obtuvo una superficie homogéneamente coloreada, probablemente debido a la falta de porosidad del monolito.

Con el fin de incrementar la porosidad del monolito, sin que la dureza se viera disminuida de manera importante, se prepararon mezclas de polimerización con relaciones monómeros:porógenos intermedias, en concreto con una relación 40:60 (mezcla 3) y 30:70 (mezcla 4).

- Mezcla 3 de polimerización:

En la Tabla 4 se muestra la composición de la mezcla de polimerización conteniendo una relación 40:60 de monómeros:disolventes porogénicos. Las condiciones de polimerización no se variaron respecto a la mezcla 2, es decir, 70°C durante 24 h.

Mezcla de polimerización 3	
Compuesto	% peso
GMA	32
EDMA	8
Cyclohexanol	55.7
1-dodecanol	4.3
LPO	0.3*

* %respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 4. Composición del polímero 3

Una vez transcurrido el tiempo de polimerización, y constatado que la dureza era adecuada, se procedió a la modificación con las AuNPs, obteniéndose un recubrimiento uniforme.

- Mezcla 4 de polimerización

En este caso, la relación monómero: disolvente porogénico fue de 30:70 como se muestra en la Tabla 5, llevándose a cabo la polimerización de nuevo a 70°C durante 24 h.

En las condiciones descritas la mezcla no polimerizó, por lo que se preseleccionó una relación 40:60 monómeros:porógenos.

Mezcla de polimerización 4	
Compuesto	% peso
GMA	24
EDMA	6
Cyclohexanol	65
1-dodecanol	5
LPO	0.3*

* %respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 5. Composición del polímero 4

- Mezcla 5 de polimerización

Con el fin de reducir el tiempo de polimerización, y basándonos en el trabajo de A. Monzo [27], se ensayó la mezcla de polimerización descrita en la Tabla 6 que, manteniendo la relación 40:60 monómeros: porógenos seleccionada, emplea AIBN como iniciador e incrementa el porcentaje de reactivo entrecruzante. La polimerización se realizó a 60°C durante tan sólo 5 h.

Mezcla de polimerización 5	
Compuesto	%
GMA	22
EDMA	18
Cyclohexanol	52
1-dodecanol	8
AIBN	1*

* %respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 6. Composición del polímero 5

De nuevo, la dureza del SBSE obtenido fue adecuada y, tras la inmovilización de las AuNPs, el imán presentó una coloración uniforme.

- Mezcla 6 de polimerización

Aunque la mezcla anterior presentó buenas características y un tiempo de polimerización reducido, la disminución del contenido de GMA implica una cantidad menor de grupos epoxi, lo que podría llevar a una disminución de la cantidad de

AuNPs que puede retenerse en la superficie. Por ello, se ensayó la mezcla de polimerización que se muestra en la Tabla 7 que combina algunas de las características de las mezclas 3 y 5. La polimerización se llevó a cabo durante 5 h a 60°C.

Mezcla de polimerización 6	
Compuesto	% peso
GMA	32
EDMA	8
Cyclohexanol	52
1-dodecanol	8
AIBN	1*

* %respecto de monómeros (GMA+EDMA)

Tabla 7. Composición del polímero 6

La dureza y permeabilidad obtenida fueron adecuadas, ya que la coloración del imán tras su modificación con las AuNPs fue uniforme, siendo esta la mezcla finalmente seleccionada

Una vez recubierto el imán con el polímero, el siguiente paso fue su modificación con la incorporación de las AuNPs, con el fin de incrementar su selectividad hacia los grupos funcionales de interés, esto es, tiol y ciano. Para ello, como se ha descrito en la sección 3.3.3 se sumergió el imán en una disolución de amoníaco, de modo que los grupos epóxido del polímero formando un grupo amino. Este tiene afinidad por el oro, de modo que cuando se sumerge el imán aminado en una disolución de AuNPs, estas quedan retenidas sobre la superficie del imán^[23].

Finalmente, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3.3. se incluyeron unas mancuernas para evitar el desgaste y deterioro del imán durante el proceso de agitación, debido al roce continuo con la base y las paredes del recipiente empleado para llevar a cabo la extracción. Las mancuernas permiten crear un espacio entre la base del recipiente y el sorbente.

4.2. Estudio del comportamiento de los SBSE frente a diferentes compuestos

4.2.1. Ciantraniliprol

El ciantraniliprol o como se conoce con el nombre químico (3-bromo-1-(3-cloro-2-pyridinil)-N-[4-cyano-2metil-6-[(metilamino)carbonil]-1H-pyrazol-5-carboxamida), es un insecticida perteneciente al grupo 28, según la clasificación IRAC (del inglés,

Insecticide resistance action committee). Este grupo, son moduladores del receptor de rianodina, es decir, desactiva estos receptores, provocando un agotamiento de las reservas de calcio, bloqueando la contracción muscular. Esto provoca que los insectos entren en una fase de letargo por parálisis muscular.^[3]

Este plaguicida está permitido en la UE, según el reglamento de Ejecución (UE) 2016/1414 de la Comisión de 24 de agosto de 2016 por el que se aprueba la sustancia activa, con arreglo al Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 de la Comisión.^[28]

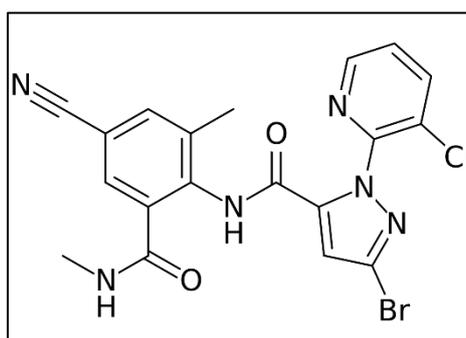


Imagen 19. Estructura química del ciantraniliprol

Como se observa en la Imagen 19, el ciantraniliprol (CYN) presenta un grupo ciano ($-C\equiv N$) en su estructura, grupo que, como se ha comentado, presenta afinidad por las AuNPs, lo que lo hace susceptible de poder ser retenido por nuestros SBSE. Su solubilidad en agua es de 14.24 mg/L, por lo que es bastante soluble en agua y se puede encontrar en el medio acuático en concentraciones importantes.

El primer paso fue poner a punto el método cromatográfico a emplear para llevar a cabo la cuantificación del CYN extraído y recuperado al aplicar el SBSE. Una revisión bibliográfica mostró que el CYN es susceptible de ser determinado por espectrofotometría, ya que absorbe en la región UV. Además, se comprobó que podía ser determinado mediante cromatografía líquida empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo: agua o metanol: agua y una columna de C18 como fase estacionaria ^{[29][30]}.

A partir de esta información, se seleccionó una mezcla de ACN: agua como fase móvil y se realizó una pequeña optimización para determinar la relación de disolventes adecuada, buscando un pico con un tiempo de elución bajo, pero suficientemente separado del frente del eluyente. Se partió de una fase móvil con un 50% de ACN, siendo las condiciones finalmente seleccionadas como óptimas las siguientes: fase móvil de ACN:agua 60:40, a un caudal de 0.8 mL/min, manteniendo la columna termostatizada a 32°C, con el fin de evitar fluctuaciones debidas a las variaciones de temperatura.

La determinación se realizará a 210 nm, donde la absorbancia fue mayor, aunque presenta un segundo pico de menor intensidad a 268 nm.

En el Gráfico 1 se muestra un cromatograma correspondiente a la inyección de 40 μL de una disolución de CYN 0.5 ppm en ACN puro.

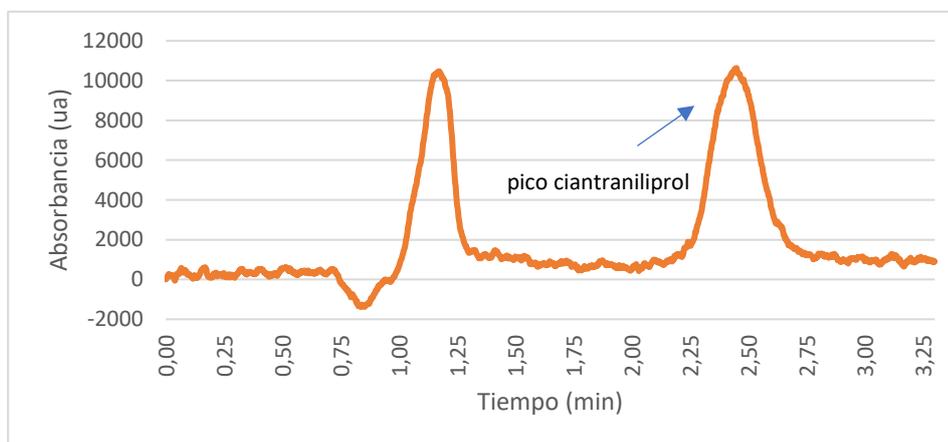


Gráfico 1. Cromatograma CYN preparado en ACN 100%. El pico a los 2.46 min corresponde al ciantraniliprol

En este cromatograma, se puede observar que el frente del eluyente aparece desde el minuto 0.75 y 1,25, mientras que el pico del ciantraniliprol aparece a los 2.46 min.

Dado que un incremento en el volumen de inyección puede llevar a un incremento de la sensibilidad del método, pudiéndose determinar así concentraciones más pequeñas, se ensayaron volúmenes mayores de muestra. Sin embargo, se observó un ensanchamiento y distorsión del pico, lo que hace desaconsejable esta estrategia.

La inyección en agua, por el contrario, proporcionó un pico de mayor eficacia (más estrecho), como se refleja en la Gráfica 2, incluso para un volumen de inyección de 100 μL (volumen máximo permitido por el automuestreador empleado).

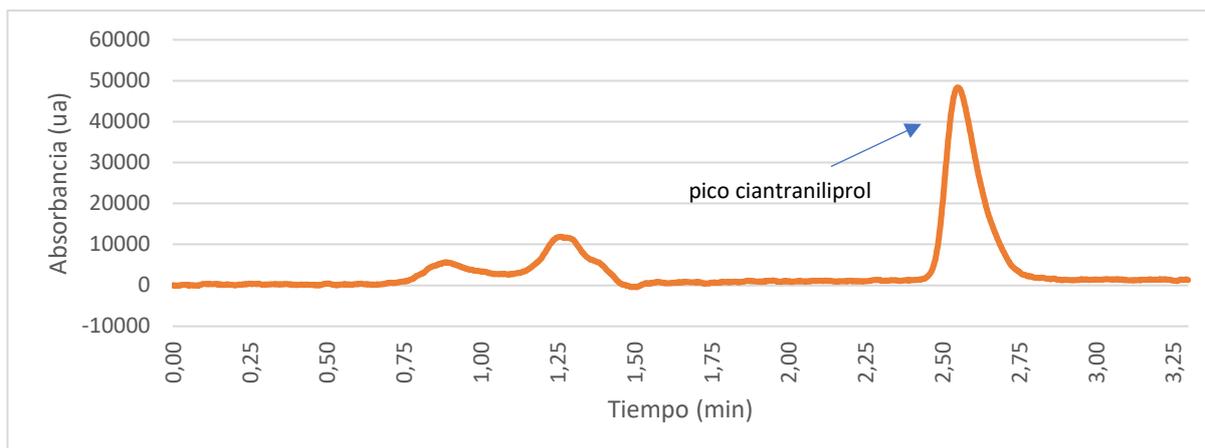


Gráfico 2. Cromatograma CYN preparado en agua

Dado que la elución del CYN del SBSE se va a realizar en ACN, se ensayaron disoluciones del analito en una composición próxima a la de la fase móvil (en concreto se prepararon en un 70% de ACN en agua) observándose que se obtenía un pico con buena simetría al inyectar disoluciones de 1 ppm en volúmenes de inyección variables entre 20 y 100 μL , existiendo además una relación directa entre el área del pico y el volumen de muestra inyectado, tal y como se muestra en el Gráfico 3. A lo largo de todo el trabajo, como señal analítica se empleó el área del pico cromatográfico, proporcionado por el programa informático.

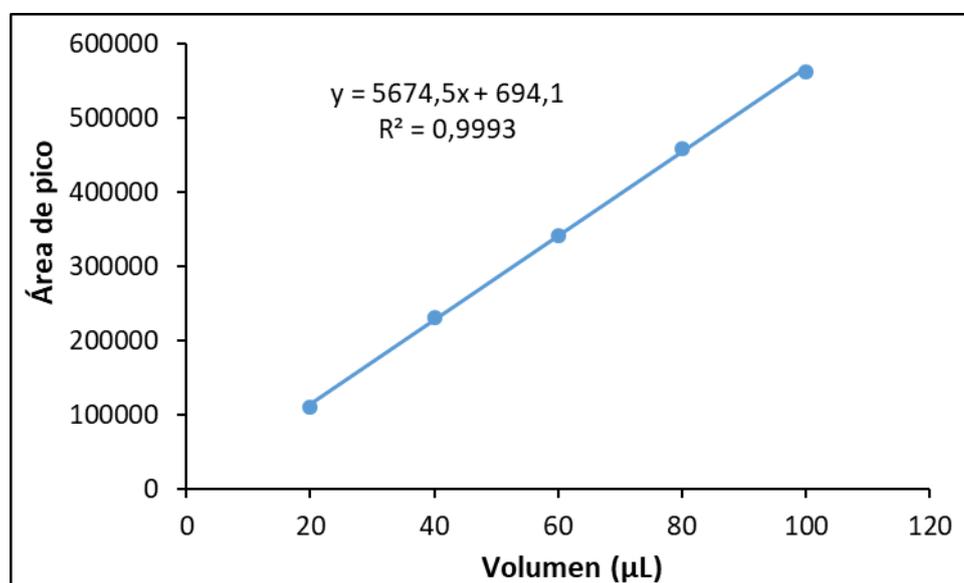


Gráfico 3. Relación Área de pico – Volumen de inyección empleando CYN preparado en 70% ACN

No obstante, dado que la elución se realizará con ACN puro, la preparación de extractos en ACN al 70% implicaría una dilución del extracto obtenido. Para simplificar el proceso, inicialmente se decidió trabajar con ACN puro e inyectar 40 μL de la

disolución de elución. Así pues, se prepararon disoluciones de CYN en ACN y se inyectó 40 µL de estas en el cromatógrafo, con el fin de determinar el intervalo de concentraciones en el que se podría llevar a cabo la determinación.

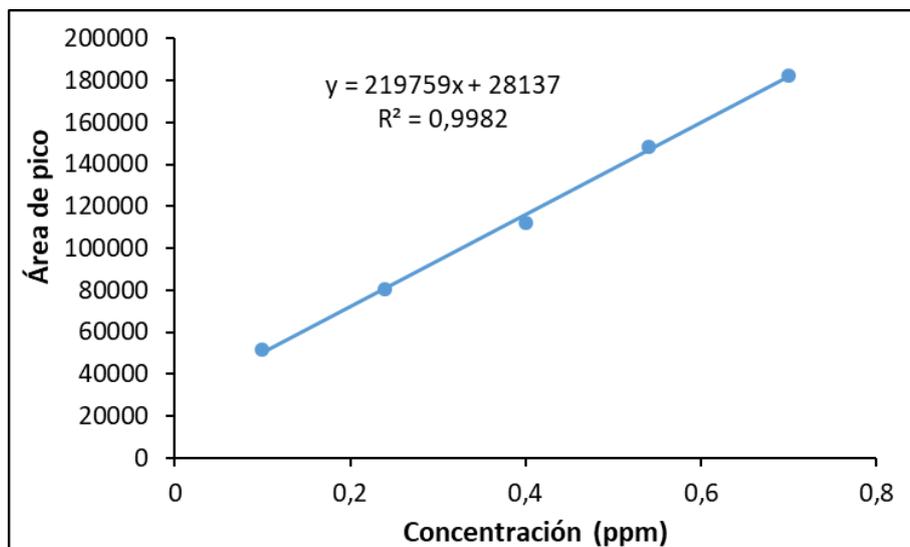


Gráfico 4. Relación Área – Concentración en CYA preparado en ACN

Como se observa en el Gráfico 4, la recta de calibrado que relaciona la concentración y el área de pico presenta una buena linealidad en el intervalo comprendido entre 0.1 y 0.7 mg/L. El coeficiente de correlación es superior al 99%, lo que significa, que los resultados obtenidos serán fiables.

Se preparó también un calibrado en agua (ver Gráfico 5), con el fin de poder determinar la concentración de CYN remanente en la disolución de carga (disolución acuosa) tras realizar el proceso de extracción, es decir, la cantidad de analito que no se ha retenido en el SBSE. En la gráfica 5 se observa que se obtuvo una buena relación lineal para concentraciones comprendidas entre 0.04 y 0.56 ppm, con un volumen de inyección fue de 100 µL.

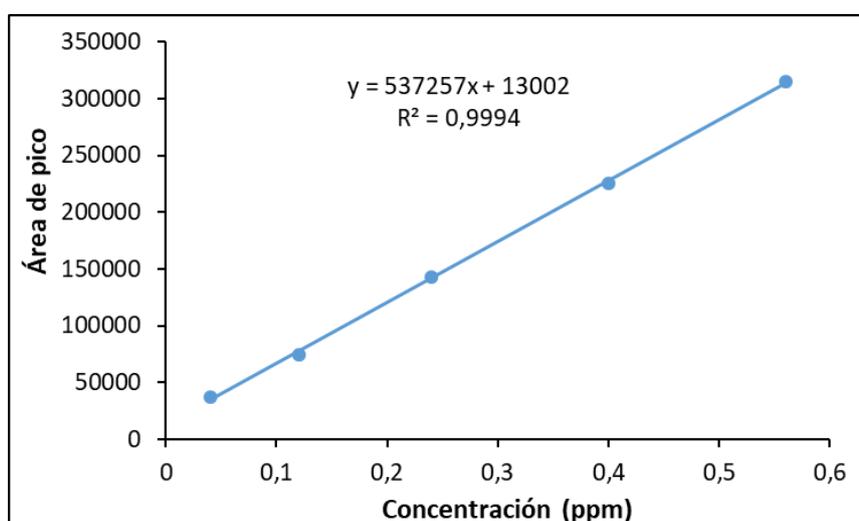


Gráfico 5. Relación Área – Concentración de CYN preparado en H₂O

Con esta información, se procedió a realizar la siguiente experiencia, con el fin de testar la capacidad de los SBSE desarrollados para extraer y preconcentrar el ciantraniliprol.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se pasó al estudio del proceso de extracción. El ciantraniliprol presenta propiedades ácido base, con un "pKa" de 8.8, lo que indica que a pH inferiores a 8.8 presentará una carga positiva al protonarse el grupo amino, y a pH superiores se encontrará como una molécula neutra. El pH, por tanto, puede ser decisivo en cómo interacciona con el sorbente. Sin embargo, a pH 9 o superior sufre hidrólisis, por lo que no es posible trabajar con pH elevados.

Para llevar a cabo la experiencia se utilizaron 9 imanes, 3 para cada uno de los valores de pH que se ensayaron, y que fueron: pH 4; pH 6.6, correspondiente al agua desionizada; y, por último, pH de 8.5. Para el ajuste de los pH se utilizó HCl o NaOH.

En el siguiente diagrama se muestran las condiciones empleadas para llevar a cabo la experiencia:

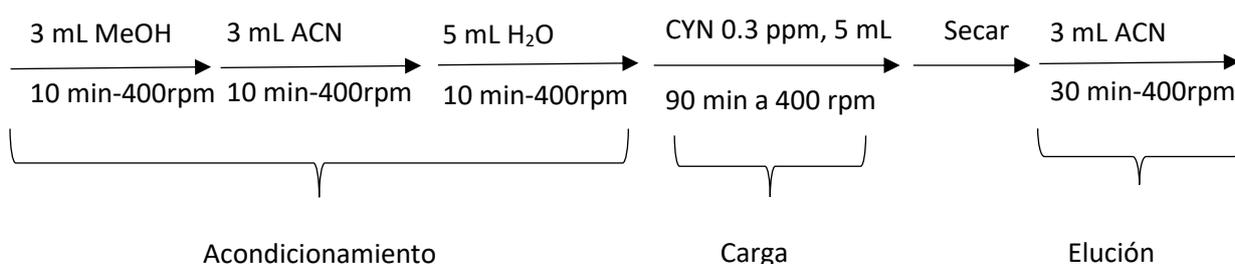


Imagen 20. Diagrama conceptual de la extracción de CYN con los SBSE

Como se muestra en el diagrama, la etapa de lavado o acondicionamiento comenzó tratando los imanes con metanol durante 10 minutos a 400 rpm para eliminar cualquier impureza que puedan contener, seguido de ACN por ser el eluyente que se va a emplear, y finalmente agua para eliminar los restos del disolvente orgánico.

A continuación, se pasa a la etapa de carga. Para ello, se introducen los imanes en 5 mL de una disolución acuosa de CYN 0.5 ppm a los distintos pHs ensayados. En esta etapa, se pretende que los imanes absorban todo el CYN presente en la muestra. Transcurridos los 90 minutos de agitación, los imanes son secados para eliminar los restos de disolución de carga.

Por último, en el proceso de elución, los imanes se sumergen en 3 mL de ACN durante 30 min a 400 rpm. En esta etapa, los imanes deberían liberar el analito en el disolvente.

En la tabla 8 se muestran las recuperaciones en masa obtenidas a los diferentes pH. Los valores mostrados corresponden a la media de las tres réplicas realizadas.

	Recuperación (% _{masa})
pH 4	4.83
pH6.6 (agua)	5.23
pH8.5	5.19

Tabla 8. Recuperaciones obtenidas de CYN en el proceso de SBSE

Como se puede observar, las recuperaciones obtenidas fueron muy bajas a todos los pH estudiados.

Para determinar si el problema se encontraba en la etapa de carga o en la de elución, se determinó también la concentración del plaguicida remanente en los 5 mL de disolución de muestra que se habían empleado en la etapa de carga, encontrándose que únicamente se había retenido entorno al 7,6% del plaguicida. Aunque hay muchos parámetros implicados en el proceso que habría que optimizar, tales como tiempo y velocidad de agitación en la etapa de carga y elución; volumen de muestra o eluyente; fuerza iónica de la muestra, naturaleza del eluyente, etc, variables todas ellas que pueden condicionar las bajas recuperaciones obtenidas, dado que nuestra finalidad era únicamente testar la potencialidad de los dispositivos desarrollados, no se procedió a dicha optimización, y se pasó a testar otros compuestos.

4.2.2. Tiacloprid

El tiacloprid o como se conoce con el nombre químico ((Z)-N-{3-[(6-cloro-3-piridinil)-metil]-1,3-tiazolan-2-iliden}cianamida), es un insecticida pertenece al grupo 4A o más conocidos como neonicotinoides según la clasificación IRAC (ver Imagen 21). Este grupo pertenece al grupo de moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina, es decir, actúa sobre el receptor nicotínico de la acetilcolina del sistema central paralizando la conducción nerviosa que está relacionada con los impulsos nerviosos. En este caso, este plaguicida actúa al entrar en contacto y/o ingestión sobre insectos chupadores y masticadores.^[3]

Este insecticida está actualmente prohibido en la UE, por el Reglamento de Ejecución (UE) de la comisión de 13 de enero de 2020. Por el que no se renueva la aprobación de la sustancia activa tiacloprid con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) n.º 540/2011 de la Comisión. ^{[31][32]}

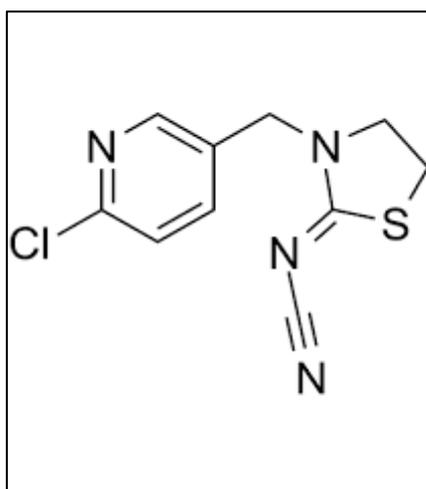


Imagen 21. Estructura química del tiacloprid

Como se ha mencionado con anterioridad, el polímero modificado con AuNPs tiene afinidad por el grupo ciano, que de nuevo está presente en la estructura del tiacloprid, motivo por lo que este compuesto fue seleccionado.

Basándonos en la información bibliográfica^[33], y tras una reoptimización de los parámetros para lograr una buena separación del tiacloprid, las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron:

- Fase móvil: 0.8 mL/min; 45% ACN; 32°C
- Absorbancia: 244 nm

En los gráficos 6 y 7 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar una disolución de tiacloprid de 0.5 ppm preparada en ACN y en agua respectivamente.

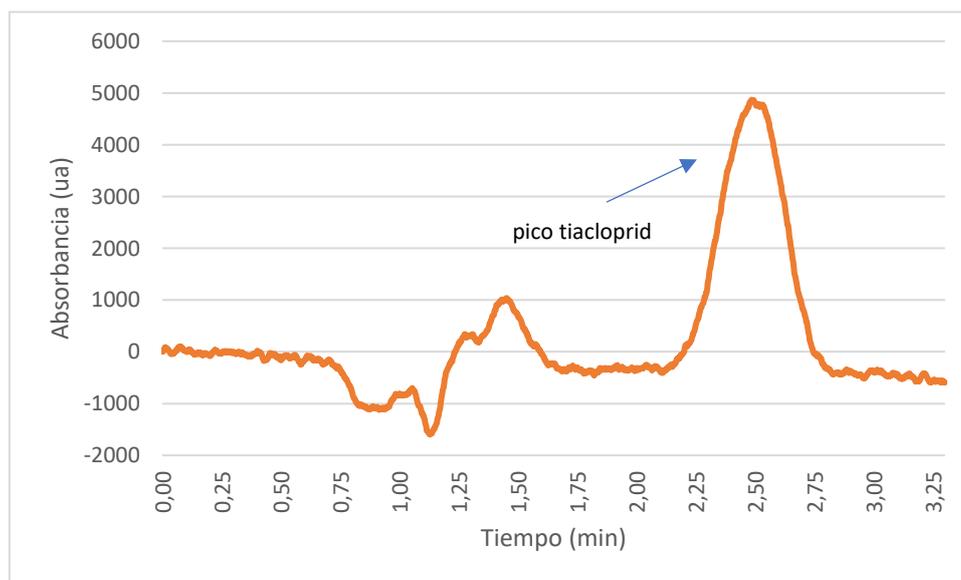


Gráfico 6. Cromatograma de tiacloprid 0.5 ppm en ACN

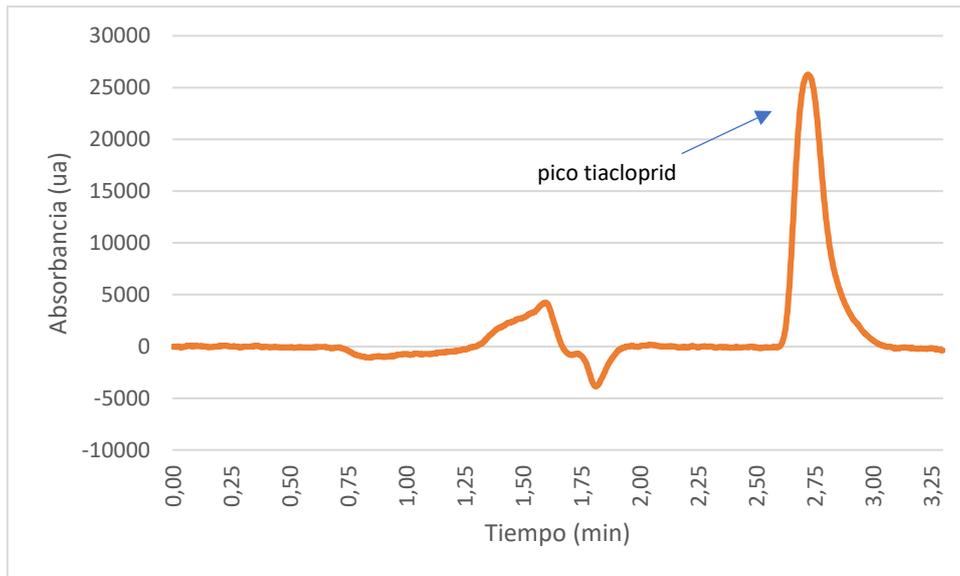


Gráfico 7. Cromatograma de tiacloprid 0.5 ppm en H₂O

Se prepararon calibrados de tiacloprid en ambos medios empleando un volumen de inyección de 40 µL en el caso del ACN y de 100 µL en el caso de emplear agua como medio de preparación del tiacloprid. Los resultados se muestran en las gráficas 8 y 9.

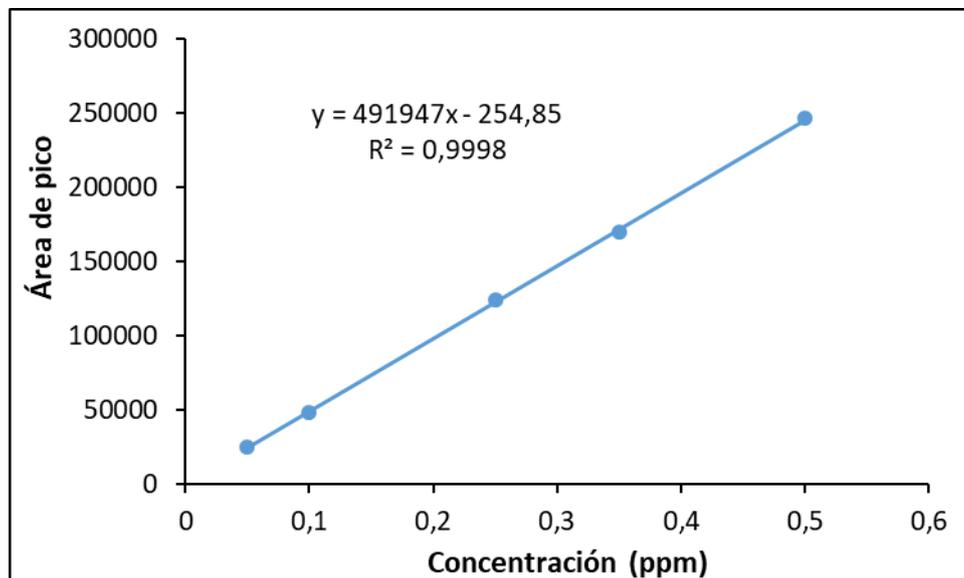


Gráfico 8. Relación Área – Concentración de Tiacloprid preparado en H₂O

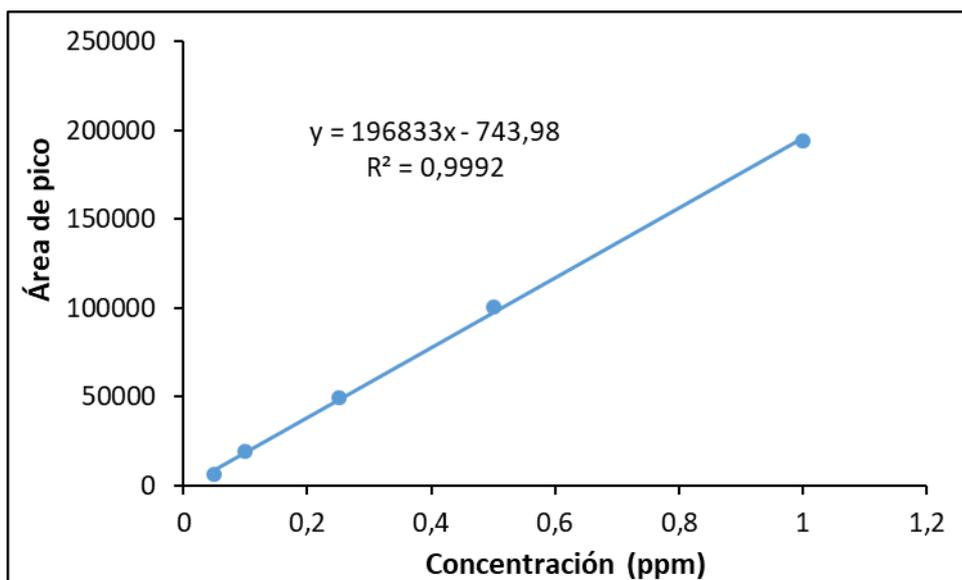


Gráfico 9. Relación Área – Concentración de Tiacloprid preparado en ACN

Como se observa, en ambos casos hubo una buena relación lineal entre la señal (área de pico) y la concentración, en los intervalos estudiados.

Para testar los sistemas de SBSE desarrollados, se emplearon las mismas condiciones que en el caso del CYN , pero empleando únicamente agua como medio de la muestra, ya que el tiacloprid carece de propiedades ácido-base. En la tabla 9 se muestra la recuperación obtenida, que es bastante prometedora, teniendo en cuenta que el sistema no se ha optimizado y se trata de un resultado preliminar.

	%recuperación
Agua	30.6

Tabla.9. Porcentaje en masa recuperado en el proceso de extracción mediante los SBSE desarrollados

4.2.3. Ditianon

El ditianon o (5,10-dioxo-5,10-dihidronafto[2,3-b]ditina), presenta grupos ciano en las posiciones 2 y 3 (ver Imagen 22). Es un fungicida que se utiliza para el control de enfermedades fúngicas que pueden aparecer en el cultivo. Este compuesto orgánico, tiene como función principal la inhibición de la germinación de esporas, crecimiento y bloqueo de los mecanismos respiratorios de los hongos^[34].

Hoy en día este fungicida está permitido en la UE, ya que se encuentra incluido en el Anejo I de la Directiva 2011/41/UE de la Comisión de 11 de abril de 2011. Reglamento

de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas^[35].

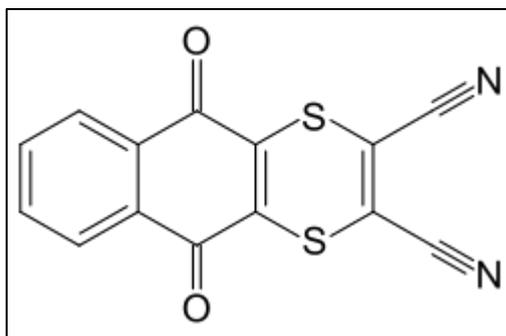


Imagen 22. Estructura química del ditianon

Las condiciones cromatográficas seleccionadas para la determinación del ditianon fueron las siguientes:

- Fase móvil; 0.8 mL/min; 70% ACN – 30% disolución acuosa de ácido acético al 0.1%
- 32°C
- Absorbancia: 232 nm

En las gráficas 10,11 y 12 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar el ditianon preparado en diversos medios.

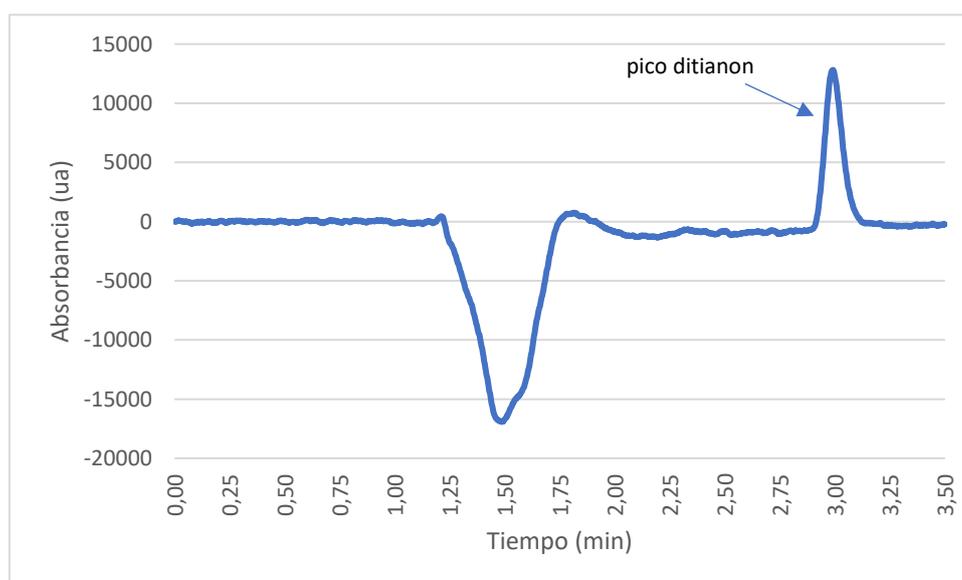


Gráfico 10. Cromatograma de ditianon 0.16 ppm preparado en 0.05%HAc

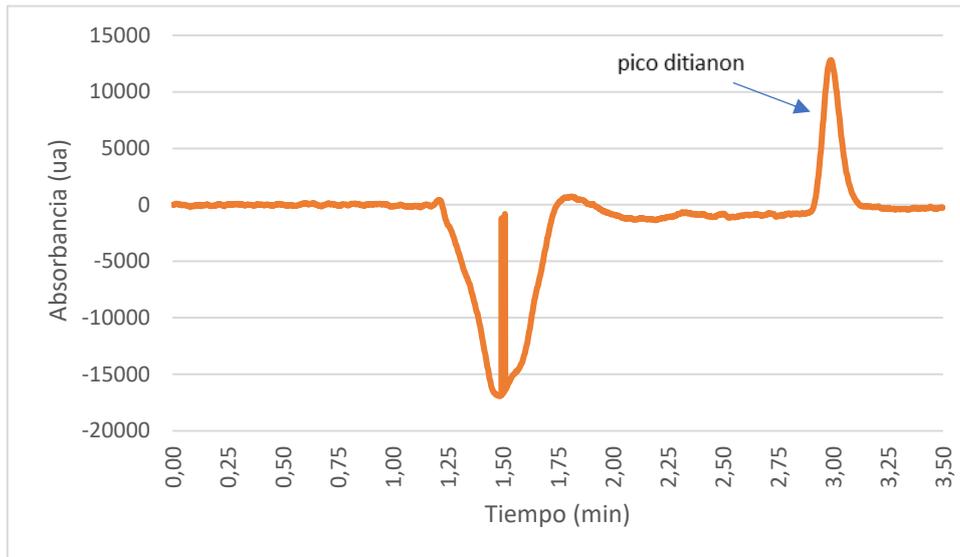


Gráfico 11. Cromatograma de ditionon 0.2 ppm preparado en agua

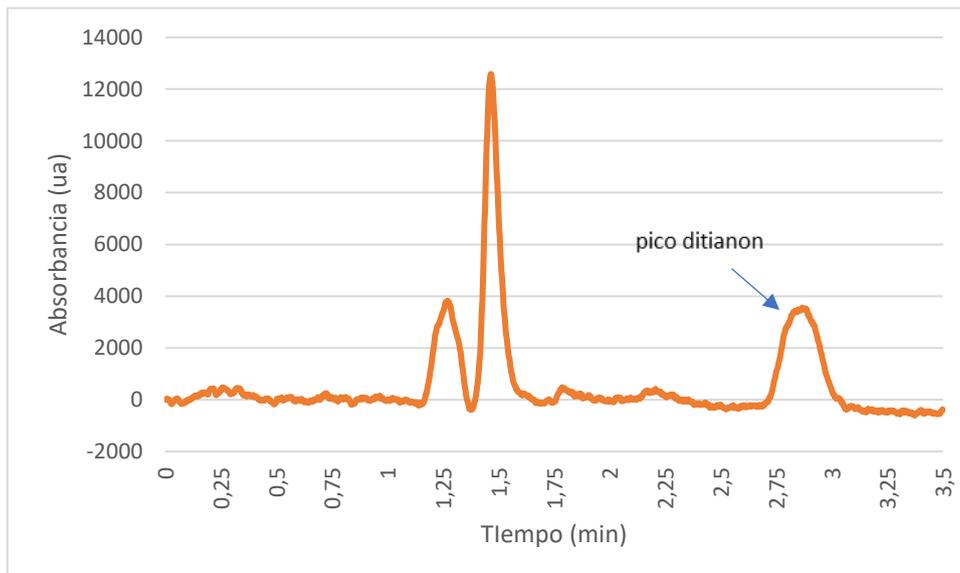


Gráfico 12. Cromatograma de ditionon 0.25 ppm preparado en ACN

En las gráficas 13 y 14 se muestran las rectas de calibrado obtenidas empleando patrones de ditionon preparados en agua y en ACN respectivamente. Se observa que el coeficiente de correlación es cercano al 0.99, en ambos casos, por lo que los resultados serían muy fiables en ambos casos.

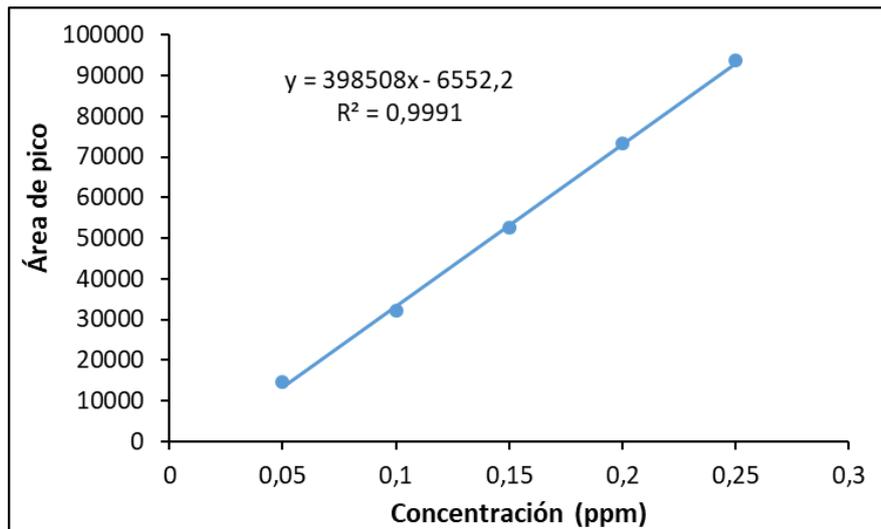


Gráfico 13. Relación Área – Concentración de ditianon en H₂O

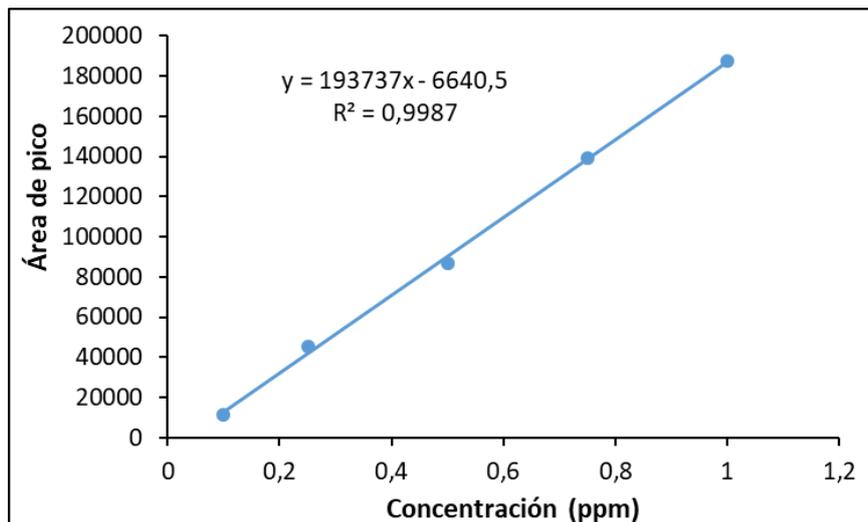


Gráfico 14. Relación Área – Concentración de ditianon en ACN

Para testar los sistemas de SBSE desarrollados, se emplearon las mismas condiciones que en los casos anteriores, pero usando disoluciones de 100 ppb de ditianon preparado en agua o en ácido acético al 0.05%, ya que en este medio la estabilidad del ditianon es mayor. En la tabla 10 se muestran las recuperaciones obtenidas que, como se, fueron bastante bajas, especialmente en ácido acético, medio en el que no se pudo detectar el plaguicida.

	%recuperación
Agua	8.7
Ácido acético 0.05%	-

Tabla 10. Porcentaje en masa recuperado en el proceso de extracción mediante los SBSE desarrollados.

4.2.4. 2-mercaptobenzotiazol

Por último, se testó el 2-mercaptobenzotiazol (MBT). Este compuesto es muy utilizado como acelerante de vulcanización de caucho de tiazol, y también actúa proporcionando mayor resistencia frente a la oxidación y corrosión. Este uso puede ser una fuente de este compuesto contaminante en las aguas naturales, pero no la única, ya que también se emplea en otros usos. Entre ellos, cabe destacar que el MBT presenta actividad fungicida. En la imagen 23, se muestra la estructura química del MBT, que como se puede observar presenta un grupo tiol (-SH), el grupo funcional con mayor afinidad por las AuNPs^[36].

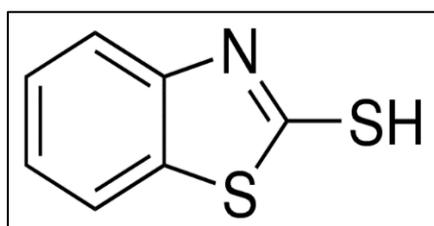


Imagen 23. Estructura química del MBT

Tras un proceso de optimización para encontrar las condiciones cromatográficas más adecuadas para llevar a cabo la determinación de MBT, se seleccionaron las siguientes condiciones:

- Fase móvil: ACN 45% a 0.8 mL/min
- 32°C
- Absorción: 322 nm

En la Gráfica 15 se muestra el cromatograma de una inyección de MBT preparado en agua en las condiciones indicadas. El pico en torno a 3.75 min corresponde al MBT, tiempo adecuado para llevar a cabo la determinación. En este caso, no se realizaron inyecciones en acetonitrilo, ya que este eluyente no es adecuado para realizar la extracción del MBT de los dispositivos de SBSE desarrollados. Esto es debido a que la afinidad de las AuNPs por el grupo tiol es tan fuerte, que los disolventes orgánicos no son capaces de romper dicha unión. Por tanto, la elución se realizará con otro tipo de extractantes como se comentará más adelante.

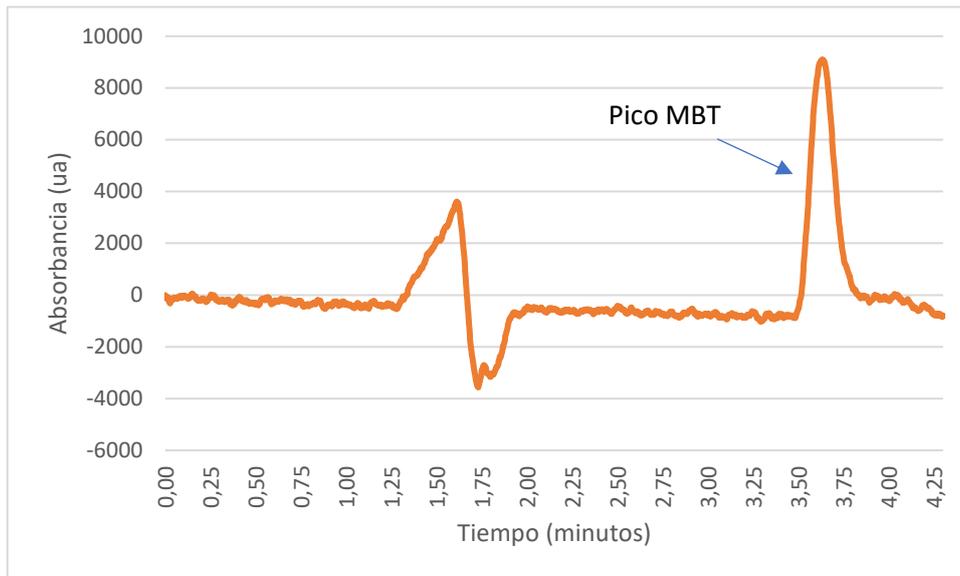


Gráfico 15. Cromatograma de MBT 100 ppb preparado en H₂O

En la Gráfica 16 se muestra un calibrado de MBT, preparado en agua. Se observa una buena linealidad y sensibilidad, ya que se pudieron medir concentraciones del orden de las ppb ($\mu\text{g/L}$).

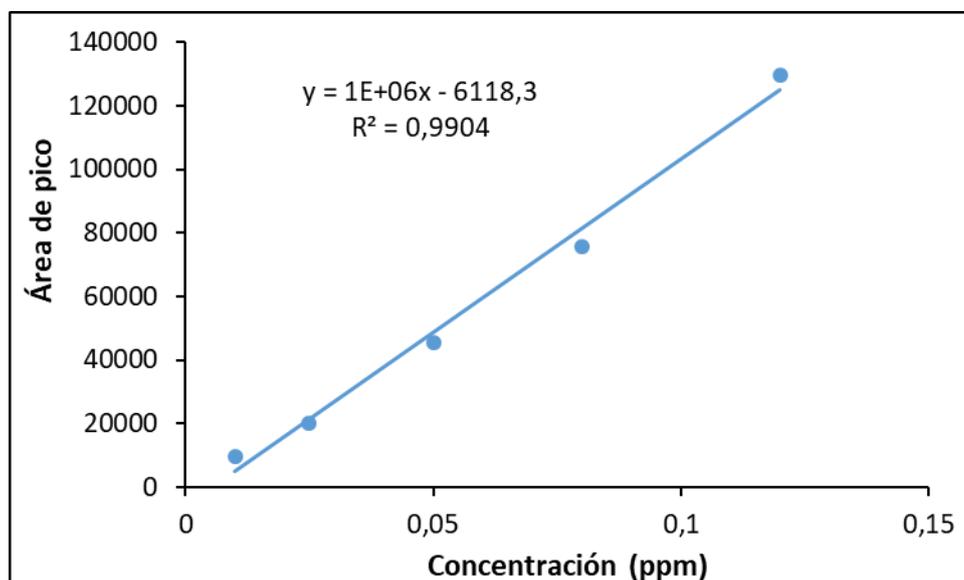


Gráfico 16. Relación Área – Concentración de MBT preparado en agua. Volumen de inyección 100 μL

Para testar los dispositivos de SBSE, se modificó el proceso respecto de los estudios anteriores, ya que, como se ha indicado, el ACN no resulta adecuado como eluyente. De acuerdo con la información bibliográfica, la forma de poder desplazar los compuestos tiolados tras su unión a las AuNPs es por desplazamiento con otro

compuesto tiolado en mayor concentración. En este sentido el ácido tioglicólico (ATG) ha demostrado su eficiencia en trabajos anteriores^[37]. Tras la elución, el ATG se puede eliminar mediante un tratamiento con agua a 80°C.

El proceso de extracción se llevó a cabo en las condiciones mostradas en la Imagen 24. En la etapa de acondicionamiento se eliminó el ACN y en la de carga la concentración de MBT fue de 50 ppb.

Para la elución se emplearon 3 mL de ATG 200 mM, manteniendo el tiempo y velocidad de agitación como en los procesos anteriores.

Por último, una vez realizada la elución, se lavaron los imanes con agua a 80°C durante 90 minutos con una agitación de 400 rpm y reponiendo el agua periódicamente. Sin embargo, se comprobó que este procedimiento no fue capaz de eliminar completamente el ATG, lo que invalidó los imanes para su posterior uso. Es necesario buscar métodos alternativos o testar el empleo de concentraciones menores de ATG para facilitar la posterior limpieza de los imanes.

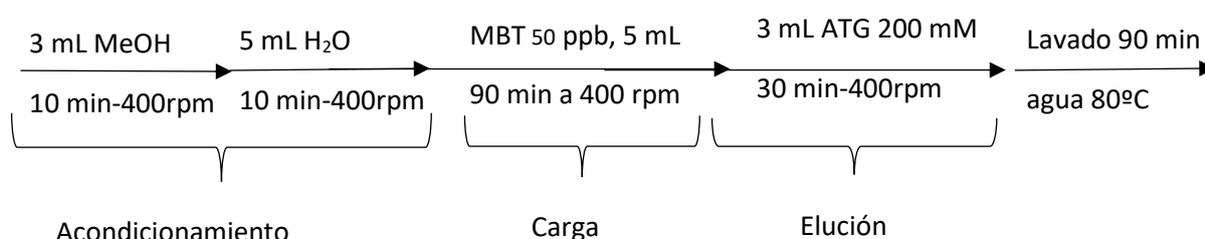


Imagen 24. Diagrama conceptual del procedimiento de extracción con las SBSE para el MBT

En la tabla 11 se muestra la recuperación obtenida en el proceso de extracción, que fue de un 66%, lo cual es un resultado muy bueno teniendo en cuenta que el proceso no ha sido optimizado.

Medio	%recuperación
Agua	66.0

Tabla 11. Recuperación en masa (%) obtenida para el MBT con el dispositivo de SBSE desarrollado.

4. Conclusiones y futuras líneas de investigación

Como se ha comentado anteriormente, los sistemas de microextracción resultan de gran interés hoy en día, no simplemente por las ventajas que proporcionan estos métodos, sino también por la gran versatilidad que pueden llegar a tener.

En este trabajo se ha puesto a punto un método de preparación por primera vez un dispositivo de SBSE basado en un polímero monolítico de GMA-EDMA en el que se han inmovilizado AuNPs, dispositivo que ha mostrado ser suficientemente robusto y apto para el trabajo durante largas horas de laboratorio, ya que no sufrieron deterioro apreciable tras su uso. Además, la inmovilización de oro fue homogénea en toda la superficie.

Los dispositivos se han testado empleando cuatro plaguicidas que presentaban en su estructura los grupos funcionales ciano (ciantraniliprol, tiacloprid y ditianon) y tiol (2-mercaptobenzotiazol).

En el caso de los plaguicidas con el grupo ciano, los resultados han sido variables, con recuperaciones entorno al 4-9 % para ciantraniliprol y diatinon, pero más elevadas (30.6%) para el tiacloprid. Teniendo en cuenta que el método no se ha optimizado, resulta una recuperación muy prometedora para poder desarrollar futuros trabajos. Por supuesto, una optimización de todas las variables implicadas en el proceso cabe esperar que permita una mejora significativa de esta recuperación. Variables tales como el volumen y fuerza iónica de la muestra, la velocidad y tiempo de agitación en la etapa de carga, la naturaleza del eluyente empleado, así como la velocidad y tiempo de agitación en la etapa de elución, son de vital importancia y pueden variar de un analito a otro.

Por otra parte, con el MBT, que presenta el grupo tiol, la retención fue muy buena, alcanzando el 66%, también en un sistema sin optimizar. Sin embargo, la dificultad para eliminar el ATG empleado como eluyente es un reto importante, ya que, de no completarse este proceso, los imanes quedan inutilizados para posteriores usos.

Este trabajo abre futuras líneas de investigación. Además de la posible optimización y aplicación de sistemas para la determinación de plaguicidas concretos, como pueden ser el tiacloprid y el MBT, quedan muchos factores que se pueden estudiar para tratar de mejorar los dispositivos de SBSE.

Por ejemplo, el tamaño de los imanes es un factor que puede determinar la cantidad de analito que se puede absorber, ya que, a mayor tamaño del imán, mayor superficie polimérica y capacidad adsorbente. Por contraposición, se necesitaría una mayor cantidad de disolvente a la hora de realizar la elución, ya que el eluyente debe cubrir todo el imán, aspecto que podría resultar contraproducente.

El polímero y el tamaño de las nanopartículas de oro también son factores que tiene influencia a la hora de realizar la extracción. En este trabajo se han empleado AuNPs de 20 nm de diámetro, pero en el comercio se pueden encontrar AuNPs de diversos tamaños y su eficacia en el proceso de retención es una variable más a estudiar.

5. Referencia

- [1] Universitat de Valencia. *Análisis químico industrial y medio ambiente. Determinación de contaminantes orgánicos.* <https://www.uv.es/gidprl/multimedia%20medioambiente_industrial/CONTAMINANTES%20ORGANICOS/index.htm>
- [2] Hernán Pepa, G. (2017) “¿Qué es y cómo se fabrica un pesticida?” en *Córdoba times*. < <https://www.cordobaitimes.com/el-campo/2017/06/07/que-es-y-como-se-fabrica-un-pesticida/>> [Consulta: 10 de junio de 2022]
- [3] IRAC online. *La clasificación del modo de acción de IRAC.* <<https://irac-online.org/mode-of-action/>> [Consulta: 4 de septiembre de 2022]
- [4] *Europa exporta plaguicidas que su industria no puede vender aquí por su alta peligrosidad. La industria agroquímica de 11 países europeos vende a 85 países no europeos sustancias nocivas.* <<https://www.libresdecontaminanteshormonales.org/2020/11/11/europa-exporta-pesticidas-prohibidos-por-su-toxicidad/>> [Consulta: 7 de septiembre de 2022]
- [5] Concepto. *Cromatografía.* < <https://concepto.de/cromatografia/> > [Consulta: 15 de agosto de 2022]
- [6] SECYTA. *Clasificación según el estado físico de la fase móvil.* < <https://www.secyta.es/es/node/13> > [Consulta: 3 de septiembre de 2022]
- [7] SECYTA. *Clasificación según el mecanismo de separación.* <<https://www.secyta.es/es/node/14>> [Consulta: 3 de septiembre de 2022]
- [8] SECYTA. *Clasificación según el tipo de lecho cromatográfico.* <<https://www.secyta.es/es/node/12>> [Consulta: 3 de septiembre de 2022]
- [9] *¿Qué es y cómo funciona un HPLC?* <<https://apuntesde.es/como-funciona-un-hplc/>> [Consulta: 15 de agosto de 2018]
- [10] Benedé Veiga, J. (2016). *Desarrollo de nuevas estrategias de microextracción. Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras de agua de interés medioambiental.* Tesis. Valencia: Universitat de València
- [11] Cromlab S.L. *Extracción en fase sólida EFS-SPE.* <http://www.cromlab.es/efs_principal.htm> [Consulta: 2 de septiembre de 2022]
- [12] Viera-Santana, S. y Santana-Rodríguez, J.J. (2013) “Técnicas avanzadas para la extracción y preconcentración de contaminantes emergentes en muestras líquidas” en *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*, 2015, vol. XXV, p. 77-95.
- [13] Peiró Simó, J. (2018). *Métodos de extracción y determinación de plaguicidas por cromatografía de gases masa (GC-MS/MS) en muestras de origen vegetal.* Trabajo fin de máster. UNED.

- [14] SigmaAldrich. Microextracci3n en fase s3lida (SPME). <<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/solid-phase-microextraction>> [Consulta: 2 de septiembre de 2022]
- [15] C.K.Hasan, A. Ghiasvand, T.W. Lewis, P.N. Nesterenko, B. Paull. (2020). "Recent advances in stir-bar sorptive extraction: Coatings, technical improvements, and applications" en *Analytica Chimica Acta*, vol. 1139, p. 222-240
- [16] Navarro Carmona, J. (2015). "Preconcentraci3n de Prote3nes en Aliments Mitjançant Sistemes D'Extracci3n en Fase S3lida". Trabajo Final de M3ster. Valencia: Universitat Polit3cnica de Val3ncia.
- [17] Cant3 Mirapeix, A. (2009). "Preparaci3n y Caracterizaci3n de Nuevas Columnas Monol3ticas de Acrilato y Metacrilato para Electro cromatograf3a Capilar". Tesis Doctoral. Valencia: Universitat Polit3cnica de Val3ncia.
- [18] Lubrizol. *¿Qu3 es la reticulaci3n? ¿Con qu3 m3todos se logran distintos resultados?* <<https://espanol.lubrizol.com/Coatings/Blog/2019/06/What-is-Crosslinking>> [Consulta: 29 de agosto de 2022]
- [19] Juan G3mez, A. (2016). *Empleo de Pol3meros Org3nicos Modificados con Nanop3rticulas de Oro como Sistema de Extracci3n en Fase S3lida de los Herbicidas Cloridazona y Metamitrona*. Trabajo final de carrera. Gand3a: Escuela Polit3cnica Superior de Gand3a.
- [20] *Free radical vinyl polymerization*. <<https://pslc.ws/spanish/radical.htm>> [Consulta: 29 de agosto de 2022]
- [21] Liu, K.; Aggarwal, P.; Lawson, JS.; Tolley, HD.; Lee, ML. (2013) "Organic monoliths for high-performance reversed-phase liquid chromatography" en *J. Sep. Sci.* 36:2767-2781.
- [22] Casas Quiroga, L. (2015). *S3ntesis y caracterizaci3n de nanop3rticulas de oro con recubrimiento polim3rico quiral*. Trabajo final de grado. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela.
- [23] Catal3-Icardo, M.; G3mez Benito, C.; Sim3 Alfonso, E.F.; Herrero Mart3nez, J.M.; "Determination of azoxystrobin and chlorothalonil using a methacrylate-based polymer modified with gold nanoparticles as solid-phase extraction sorbent" en *Analytical and bionalytical Chemistry*, vol. 409, (2017), p. 243-250.
- [24] Nadal, J.C.; Catal3 Icardo, M.; Borrull, F.; Herrero Mart3nez, J.M.; Marc3, R.M.; Fontanals, N. (2022). "Weak anion-exchange mixed-mode materials to selectively extract acidic compounds by stir bar sorptive extraction from environmental waters" en *Chromatogr. A*, vol. 1663, 462748.
- [25] Ten-Dom3nech, I.; Sim3 Alfonso, E.F.; Herrero Mart3nez, J.M. (2017). "Isolation of human milk whey proteins by solid phase extraction with a polymeric material modified with gold nanoparticles" en *Microchem. J*, vol. 133, p. 320-326.

[26] Fresco Cala, B. y Cárdenas, S. (2018). “Nanostructured hybrid monolith with integrated stirring for the extraction of UV-filters from water and urine samples” en *Talanta*, vol. 182, p. 391–395

[27] Monzo, A.; Rejtar, T.; Guttman, A. (2009) “Optimization of poly(GMA-co-EDMA) monolithic support for trypsin nanoreactor fabrication”, en *J. Chromatogr. Sci*, vol. 47, p. 467-472.

[28] Portal Tecno Agrícola. *Ciantraniliprol*. <<https://www.buscador.portaltecnogricola.com/vademecum/esp/producto-tecnico/10577/CIANTRANILIPROL>> [Consulta: 15 de agosto de 2022]

[29] Kumar, N.; Narayanan, N.; Banerjee, T.; Sharma, R.K.; Gupta, S. (2021). “Quantification of field-incurred residues of cyantraniliprole and IN-J9Z38 in cabbage/soil using QuEChERS/HPLC-PDA and dietary risk assessment” en *Biomed. Chromatogr*, vol. 35, e5213

[30] Ma, W.; Li, K.; Li, X.; Liu, H. (2022). “Enrichment of diamide insecticides from environmental water samples using metal-organic frameworks as adsorbents for determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry” en *J. Hazard. Mater*, vol. 422, 126839

[31] Agronegocios. *Bruselas prohíbe renovar el insecticida tiacloprid por sus riesgos para la salud y el medio ambiente*. <<https://www.agronegocios.es/bruselas-prohibe-renovar-el-insecticida-thiacloprid-por-sus-riesgos-para-la-salud-y-el-medio-ambiente/>> [Consulta: 15 de agosto de 2022]

[32] España. Boletín Oficial del Estado (BOE). *Código de Derecho Agrario (V) Sanidad vegetal y productos fitosanitarios*. 26 de julio de 2022, pág. 181.

[33] Ying, G.G. y Kookana, R.S. (2004). “Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam in soil and water by high-performance liquid chromatography with diode-array detection” en *J Environ Sci Health*, B. 39, p. 737-46.

[34] Zhejiang Rayfull Chemicals Co., Ltd. *Ditianon*. <<http://m.cropprotection.net/fungicide/dithianon.html>> [Consulta: 5 de septiembre de 2022]

[35] Terralia, *Ditianona*. <https://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_composition?book_id=1&composition_id=17840&vulgar_id=3952> [Consulta: 5 de septiembre de 2022]

[36] Chemball. *2-Mercaptobenzothiazole/2-MBT/MBT*. <https://www.chemball.com/product/9D9A63/2-Mercaptobenzothiazole%2F2-MTB%2FMTB.html?gclid=Cj0KCQjwguGYBhDRARIsAHgRm4-3DIpkATk-U5TkckpymLtBUg-g0pcB3rCA4AGzwZMYSjgN74J1BrkaAouwEALw_wcB> [Consulta: 5 de septiembre de 2022]

[37] O. Mompó-Roselló, M. Vergara-Barberán, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez. (2020). "In syringe hybrid monoliths modified with gold nanoparticles for selective extraction of glutathione in biological fluids prior to its determination by HPLC", en *Talanta*, vol. 209, 120566.