

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

Grado en Ciencias Ambientales



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

**“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN
POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR
PARA LA EXTRACCIÓN DEL PLAGUICIDA
MCPA EN MUESTRAS DE AGUA ”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a:
Roberto Beltrán Martí

Tutor/a:
Susana Meseguer Lloret
Sagrario Torres Cartas

GANDIA, 2019

RESUMEN

En el análisis de muestras medioambientales, la mejora de los procesos de tratamiento de la muestra para la extracción del compuesto de interés, así como su pre-concentración y limpieza, están en pleno desarrollo. Esta etapa de extracción es esencial en el análisis de plaguicidas en muestras de agua reales, dadas las bajas concentraciones permitidas (nivel máximo permitido para plaguicidas individuales 0.1 µg/L).

Los polímeros de impronta molecular (MIP) son polímeros estables, sintetizados en el laboratorio en presencia del compuesto a determinar (plantilla), que presentan características de reconocimiento molecular que aumentan la selectividad en los procesos de extracción.

En el proyecto se ha desarrollado un MIP que permite la extracción selectiva del herbicida ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA). El polímero se ha obtenido térmicamente a partir de una mezcla que contiene un monómero, un entrecruzante, un disolvente porogénico y un iniciador radicalario. La mezcla de polimerización ha de contener además una determinada cantidad de MCPA, que se ha de eliminar tras la polimerización dejando su huella en la estructura. También se ha sintetizado el polímero en ausencia del plaguicida (polímero sin impronta, NIP).

El polvo del polímero sintetizado se ha empaquetado en cartuchos para realizar la extracción en fase sólida del MCPA. Tras la etapa de extracción, el análisis del plaguicida se ha realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Las condiciones de la polimerización (monómero empleado, porógeno y tiempo de contacto monómero-plantilla) se han optimizado con el objetivo de conseguir una extracción selectiva del plaguicida.

Además, se han establecido las condiciones óptimas para la extracción en fase sólida del plaguicida MCPA (lavado, tipo y volumen de eluyente, capacidad de pre-concentración, etc.), y se ha comprobado la capacidad de extracción del sorbente para otros plaguicidas fenoxiácidos con estructuras similares. Finalmente, se ha empleado el polímero MIP para la extracción en fase sólida del MCPA y otros 5 plaguicidas fenoxiácidos en muestras de agua de diferente procedencia.

Palabras clave: *polímero de impronta molecular; MCPA; extracción en fase sólida; aguas; preconcentración*

ABSTRACT

In the analysis of environmental samples, the improvement of sample treatment processes for the extraction of target compounds, as well as its pre-concentration and cleaning, are in full development. This extraction step is essential in the analysis of pesticides in real water samples, due to their low concentrations allowed (maximum residue limit for individual pesticides is 0.1 µg/L).

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are stable polymers, synthesized in the laboratory in presence of the selected analyte (template), which have molecular recognition characteristics that increase the selectivity in the extraction process.

In this work, a MIP that permits the selective extraction of the 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic (MCPA) herbicide has been developed. The polymer has been thermally obtained from a mixture containing a monomer, a crosslinker, a porogen and a radical initiator. The polymerization mixture also contained an amount of MCPA, which was eliminated after polymerization leaving a mark on the structure. Also a polymer in the absence of plaguicide was synthesised (non imprinted polymer).

The powder of the synthesized polymer has been packed into cartridges to perform the solid phase extraction of MCPA. After that, the analysis of the pesticide has been carried out by high performance liquid chromatography.

The polymerization conditions (monomer, porogen and monomer-template contact time) have been optimized with the aim of achieving a selective extraction of the plaguicide.

In addition, optimal conditions for the solid phase extraction of MCPA (washing solvent, type and volume of eluent, concentration factor, etc.) have been established, and the extraction capacity of the sorbent for other phenoxyacid plaguicides with similar structures has been proven. Finally, the MIP polymer has been applied to the solid phase extraction of MCPA and other 5 phenoxyacid plaguicides in real water samples from different sources.

Keywords: *molecularly imprinted polymer; MCPA; solid phase extraction; waters; preconcentration*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLAGUICIDAS.....	1
1.1.1. HERBICIDAS FENOXIÁCIDOS.....	1
1.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	4
1.3. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR.....	6
1.3.1. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR.....	6
1.4. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	10
1.4.1. PRINCIPIOS BÁSICOS.....	10
1.4.2. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO.....	11
1.4.3. INSTRUMENTACIÓN.....	12
1.4.4. CROMATOGRAMA Y PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	15
2. CONTEXTO	16
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	17
4.1. MATERIAL, REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	17
4.2. INSTRUMENTACIÓN.....	17
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	19
5.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR Y SUS CORRESPONDIENTES POLÍMEROS SIN IMPRONTA.....	19
5.1.1. SÍNTESIS DE MIP Y NIP CON EL MONÓMERO MAA.....	19
5.1.2. SÍNTESIS DE MIP Y NIP CON EL MONÓMERO 4-VP.....	20
5.2. LAVADO DE MIP Y NIP.....	22
5.2.1. SISTEMA DE FILTRACIÓN DE DISOLVENTES PARA HPLC.....	22
5.2.2. SISTEMA DE EXTRACCIÓN <i>SOXHLET</i>	23
5.3. PREPARACIÓN DE LOS CARTUCHOS.....	24
5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	25
5.4.1. PROCEDIMIENTO PARA POLÍMEROS DE MAA.....	26
5.4.2. PROCEDIMIENTO PARA POLÍMEROS CON 4-VP.....	26
5.5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS: HPLC.....	27
5.5.1. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS INDIVIDUAL DEL MCPA.....	27
5.5.2. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LA MEZCLA DE 6 PLAGUICIDAS DE LA FAMILIA DEL MCPA.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1. ANÁLISIS INDIVIDUAL DEL MCPA Y ANÁLISIS DE LA MEZCLA DE 6 PLAGUICIDAS FENOXIÁCIDOS MEDIANTE HPLC.....	28
6.2. ESTUDIO CON MIP Y NIP DE MAA PARA MCPA.....	31
6.2.1. SPE CON MIP Y NIP DE MAA: ETAPA DE LAVADO CON AGUA....	31
6.2.2. SPE CON MIP Y NIP DE MAA: ETAPA DE LAVADO CON ACN.....	32
6.2.3. SPE CON MIP Y NIP DE MAA: ETAPA DE LAVADO CON DICLOROMETANO.....	33
6.3. ESTUDIO CON MIP Y NIP DE 4-VP TOLUENO 20 MIN PARA MCPA.....	34
6.3.1. SPE CON MIP Y NIP DE 4-VP TOLUENO 20 MIN: ETAPA DE LAVADO CON DICLOROMETANO.....	34
6.3.2. SPE CON MIP Y NIP DE 4-VP TOLUENO 20 MIN: ETAPA DE LAVADO CON TOLUENO.....	34

6.3.3. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE LAVADO CON AGUA.....	35
6.3.4. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE LAVADO CON MEOH:AGUA EN DIFERENTES PROPORCIONES.....	35
6.3.5. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE LAVADO CON ACN:AGUA EN DIFERENTES PROPORCIONES.....	36
6.3.6. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE CARGA Y LAVADO A DIFERENTES pHs.....	37
6.4. ESTUDIO CON MIP Y NIP DE 4-VP ACN 24 HORAS PARA MCPA.....	38
6.4.1. SPE CON MIP Y NIP DE 4-VP ACN 24 HORAS: ETAPA DE LAVADO CON DICLOROMETANO.....	38
6.4.2. SPE CON MIP Y NIP DE 4-VP ACN 24 HORAS: ETAPA DE LAVADO CON AGUA.....	39
6.5. CAPACIDAD DE PRECONCENTRACIÓN DEL MIP 4VP ACN 24 HORAS.....	39
6.5.1. ESTUDIO DEL VOLUMEN Y COMPOSICIÓN DEL ELUYENTE.....	40
6.5.2. ESTUDIO DEL VOLUMEN DE RUPTURA.....	41
6.6. SPE DE MEZCLAS DE PLAGUICIDAS FENOXIÁCIDOS CON MIP 4-VP ACN 24 HORAS.....	43
6.7. APLICACIÓN DE SPE A MUESTRAS DE AGUA REALES CON MIP 4VP ACN 24 HORAS.....	43
6.7.1. SPE DE MUESTRA DE AGUA DE GRIFO DE ÓSMOSI (SUECA).....	44
6.7.2. SPE DE MUESTRA DE AGUA DE POZO.....	44
6.7.3. SPE DE MUESTRA DE AGUA MINERAL (BEZOYA).....	45
7. CONCLUSIONES.....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que permiten prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales. También regulan las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, etc. Además, los plaguicidas pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en sus cuerpos. (FAO, 2002)

Existe gran variedad de plaguicidas y de sistemas para su clasificación, según su origen, su estado, su composición química o su acción específica entre otros. Según su acción específica encontramos fungicidas, herbicidas, insecticidas, acaricidas, reguladores del crecimiento de las plantas, etc.

1.1.1. HERBICIDAS FENOXIÁCIDOS

Los herbicidas fenoxiácidos son derivados del ácido fenoxiacético que se usan ampliamente en agricultura y deben su éxito a dos propiedades: la fuerte actividad herbicida, que permite utilizarlos en pequeñas dosis, y su gran selectividad.

Estos herbicidas tienen una elevada toxicidad tanto para humanos como para animales, produciendo impactos acumulativos e irreversibles que ponen en peligro a las personas y a los ecosistemas, y pueden dar problemas en generaciones siguientes. (E.Herrero; E. Rodríguez-Gonzalo; M.S. Rodríguez-Cruz; R. Carabias-Martínez; M.J. Sánchez-Martín, 2015)

Algunos de los herbicidas fenoxiácidos más conocidos, que se usan como herbicidas de post-emergencia, se muestran en la Tabla 1.

MCPA

El ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético (MCPA, Tabla 1) es un herbicida que, junto con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y otros homólogos, se considera un “herbicida hormonal” o regulador del crecimiento. (Barberá, 1989). El MCPA se emplea habitualmente para el control de malezas de hoja ancha y se utiliza en agricultura para el control anual y perenne de malas hierbas en cereales, pastizales y árboles, especialmente por su precio relativamente bajo y su elevada eficiencia. En España se utiliza principalmente en el control de crecimiento de malezas en árboles frutales como los limoneros y en los cultivos de arroz.

Actualmente, según el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) se

comercializan 12 formulaciones distintas para el MCPA (en forma de ácido, sal o éster), solo o combinado con otros plaguicidas, como la formulación 2,4-D ACIDO (sal amina) + MCPA (sal amina), comercializado por NUMFARB ESPAÑA S.A., o la formulación MCPA (sal dimetilamina), distribuido por la misma empresa. Las formulaciones varían según el cultivo y la plaga a tratar.

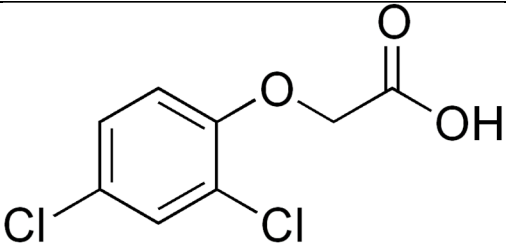
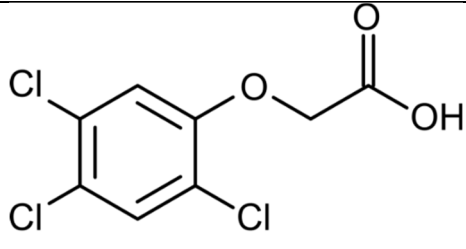
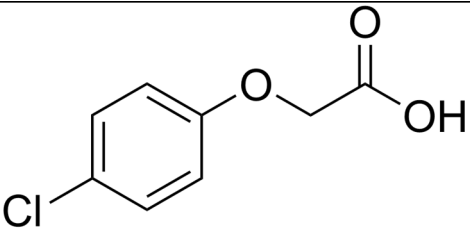
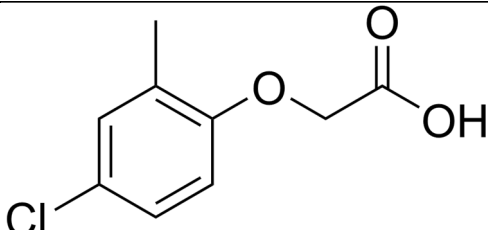
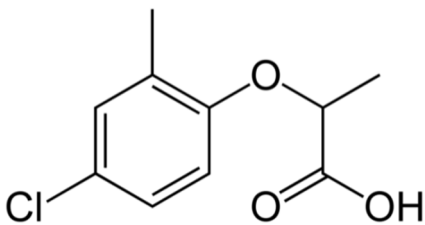
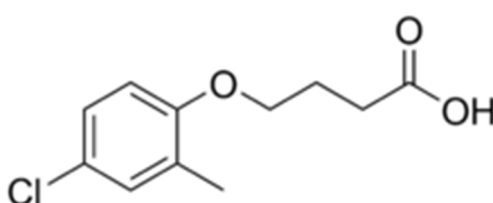
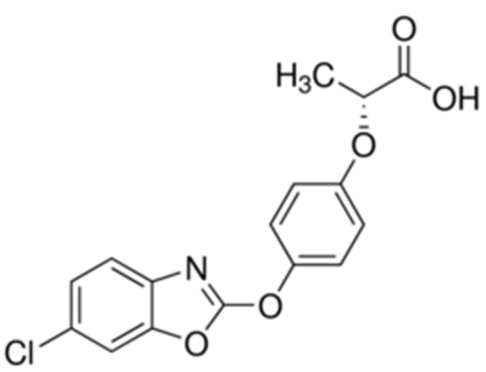
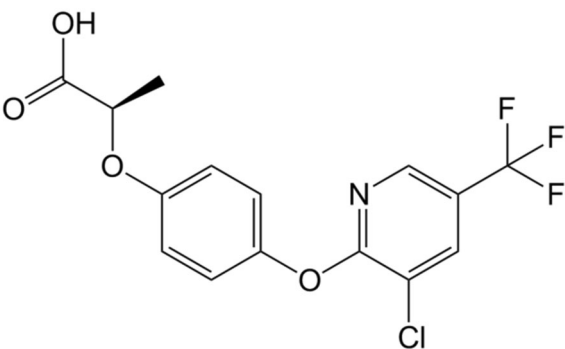
Debido a que el MCPA presenta una elevada solubilidad en agua, puede pasar fácilmente a las aguas superficiales o a las aguas subterráneas a través de drenaje natural o infiltración (S. Torres-Cartas; C. Gómez-Benito; S. Meseguer-Lloret, 2012). Como consecuencia de su toxicidad, es necesario controlar la posible contaminación de las aguas con pesticidas para la protección del medio ambiente.

La legislación española estableció para las aguas de consumo humano, una concentración máxima total de pesticidas de $0,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un máximo de $0,10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cualquier pesticida individual (Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, 2003)

Teniendo en cuenta los bajos niveles máximos permitidos para plaguicidas en aguas, el análisis del MCPA y otros plaguicidas en esta matriz, requiere de una etapa previa de pre-concentración previa al análisis del plaguicida. Con la pre-concentración de la muestra, se consigue tener en disolución una concentración del plaguicida que es cuantificable empleando los sistemas de detección habituales.

La preconcentración del MCPA y otros plaguicidas puede conseguirse empleando sistemas de extracción en fase sólida, cuyas características se explican a continuación.

Tabla 1: Estructuras químicas de los herbicidas fenoxiácidos

 <p>2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)</p>	 <p>2,4,5-T (2-(2,4,5-triclorofenoxi) ácido acético)</p>
 <p>4CPA (Ácido 4-clorofenoxiacético)</p>	 <p>MCPA (4-cloro-2-metilfenoxi)acético)</p>
 <p>MCPP (Mecoprop)</p>	 <p>MCPB (Ácido 4(4-cloro-o-toliloxi) butírico)</p>
 <p>Fenoxaprop</p>	 <p>Haloxyfop</p>

1.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (conocida *en inglés* como *solid phase extraction*, SPE) es una técnica ampliamente utilizada para el tratamiento de muestras que permite, por una parte, la limpieza de la muestra al separar al analito o compuesto de interés del resto de la matriz y, por otra parte, la preconcentración del mismo. La SPE permite prevenir problemas habituales en técnicas de extracción sencillas como la extracción líquido-líquido, tales como las recuperaciones no cuantitativas, es decir, la separación incompleta del analito de la matriz de la muestra. También se considera un método económico porque no necesita el uso de equipos costosos, y respetuoso con el medio ambiente porque no necesita el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos. (Soledad-Rodríguez, 2017)

Esta técnica consiste en percolar un volumen conocido de muestra a través de un sorbente sólido empaquetado en un cartucho, columna o disco, bajo condiciones cuidadosamente controladas que favorecen la absorción preferencial del analito sobre el sorbente frente a otros componentes de la matriz. El analito se recupera del sorbente extrayéndolo en un pequeño volumen de una mezcla de disolventes apropiada. Para llevar a cabo la extracción en fase sólida, se han de seguir las siguientes etapas (Figura 1):

- **Acondicionamiento:** en primer lugar, se ha de mojar el sorbente empaquetado en el cartucho con un disolvente adecuado que permite la correcta absorción del analito en la etapa posterior.
- **Carga:** con el sorbente en las condiciones adecuadas, se hace pasar un determinado volumen de muestra que contiene el analito y otras especies que no interesan.
- **Lavado:** tras la carga, se hace pasar por el sorbente un pequeño volumen de disolución de lavado que permitirá eliminar los componentes de la matriz de la muestra que no se retienen en el sorbente, consiguiendo así la limpieza de la muestra. En esta etapa el analito debe permanecer retenido en el sorbente.
- **Secado:** el sorbente con el analito retenido debe secarse eliminando restos del disolvente de muestra.
- **Elución:** en esta etapa se hace pasar un volumen pequeño de disolvente o mezcla de disolventes que permita extraer al analito del sorbente.

Si el volumen de muestra procesado en la carga es grande y el volumen empleado para la elución es más pequeño, se consigue tras el proceso de SPE completo, la preconcentración del analito, lo que facilitará su detección mediante sistemas analíticos sencillos.

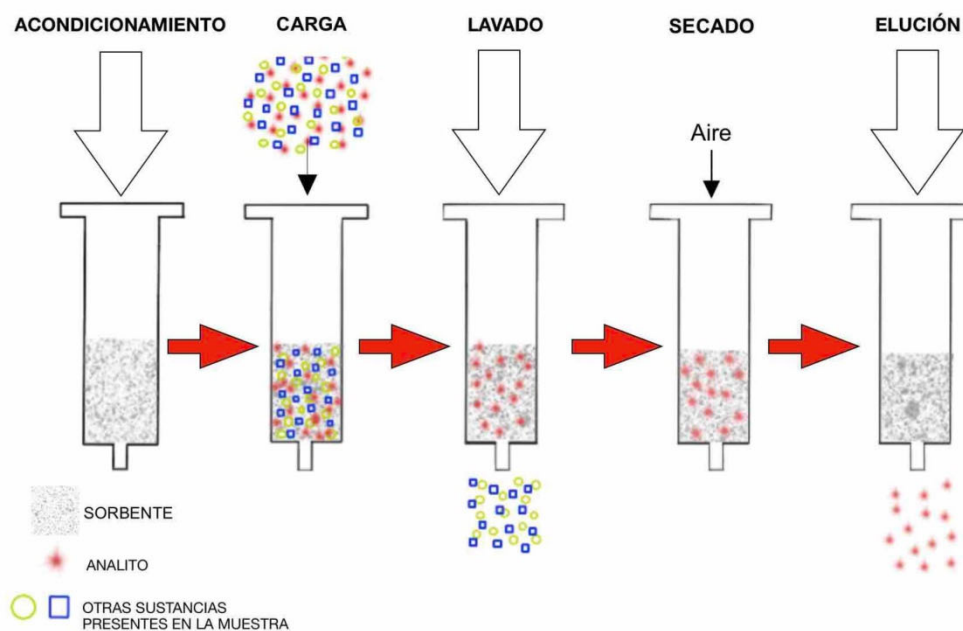


Figura 1: Mecanismo de extracción en fase sólida

Los sorbentes comerciales más utilizados pueden ser hidrofóbicos, hidrofílicos y de intercambio (Cromlab).

Los sorbentes hidrofóbicos presentan en su estructura grupos funcionales no polares con cadenas alquílicas y aromáticas que, mediante fuerzas de Van der Waals, presentan afinidad por compuestos de polaridad media y baja. Así, por ejemplo, se recomienda el uso de polímeros tipo poliestireno-divinilbenceno para compuestos aromáticos.

Los sorbentes hidrofílicos, poseen grupos funcionales tipo ciano (CN) o amino (NH₂). Los sorbentes que poseen grupos CN en su estructura, pueden usarse tanto para la extracción de compuestos polares, como para la extracción de compuestos de polaridad media. Los sorbentes hidrofílicos que poseen grupos NH₂ pueden usarse para retener ácidos fuertes, o bien como adsorbente polar, ya que interactúa con grupos polares tipo alcohol (OH), amino (NH) o tiol (SH).

Los sorbentes de intercambio se basan en la interacción entre iones. Las fases de intercambio aniónico se usan para la extracción de ácidos débiles con una o más cargas negativas, y las fases de intercambio catiónico se usan para la extracción de compuestos débilmente básicos con una o más cargas positivas.

Existen gran cantidad de sorbentes comerciales con distintas características. En los últimos años, la investigación en química analítica muestra una gran tendencia al desarrollo de

nuevos sorbentes que sean específicos y selectivos para el análisis de compuestos o familias de compuestos de interés. En este sentido, se están desarrollando polímeros de impronta molecular (conocidos *en inglés* como *molecularly imprinted polymers*, MIPs) los cuales se pueden sintetizar en el laboratorio y empaquetar en una jeringa o cartucho. Su alta afinidad y selectividad hacen que el factor de preconcentración sea grande, permitiendo disminuir los límites de detección.

1.3. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

Los polímeros de impronta molecular (MIP) son polímeros sintéticos altamente estables, los cuales poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo ya que dentro de la matriz del polímero existen “huecos” complementarios al analito en forma o grupos funcionales.

Además, son polímeros versátiles, económicos, resistentes, estables a presiones y temperaturas elevadas, y químicamente inertes a ácidos y bases, iones metálicos y disolventes orgánicos. La aplicación de los polímeros de impronta molecular es muy amplia, ya que se usan en análisis químico, ambiental, farmacológico y de la salud. Su capacidad de reconocimiento molecular ha facilitado la aplicación de los MIPs como sensores y biosensores, como imitadores de anticuerpos artificiales, en catálisis, como fase estacionaria en procesos de separación cromatográfica, o como sorbentes en procesos de extracción en fase sólida de compuestos de interés ambiental como productos farmacéuticos (morfina, naproxeno) y plaguicidas de diferente naturaleza (diclofenac, diclorvós, atrazina, malatión, etc) (Soledad-Rodríguez, 2017).

Para realizar la síntesis de estos polímeros es necesario que la polimerización se lleve a cabo en presencia del analito (compuesto plantilla) que se va a determinar posteriormente. Tras la polimerización, será necesario eliminar por completo el compuesto plantilla de la estructura polimérica quedando libres los huecos en la estructura que permitirán la posterior retención selectiva del compuesto gracias a interacciones específicas, que se comentarán a continuación.

1.3.1. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR

En la Figura 2 se muestra el proceso de síntesis de un MIP. En la primera etapa se ponen en contacto, durante un tiempo establecido, el compuesto plantilla con un monómero adecuado y una cantidad pequeña de porógeno, dando lugar al complejo de pre-polimerización. Posteriormente, en la segunda etapa, al complejo de pre-polimerización se le añade el reactivo entrecruzante o crosslinker, el iniciador y el porógeno. En esta etapa se requiere calor o luz ultravioleta para que el proceso de polimerización se complete correctamente. Por último, se elimina el compuesto plantilla del polímero mediante un proceso de lavado, dejando una cavidad o “huevo” dentro de la matriz del polímero que

será la característica fundamental de éste, siendo complementaria al analito en tamaño, forma y grupos funcionales.

La eliminación del compuesto plantilla tras la polimerización suele realizarse mediante extracción sólido-líquido a temperatura ambiente, extracción por el método *Soxhlet*, o tratamiento térmico, entre otros.

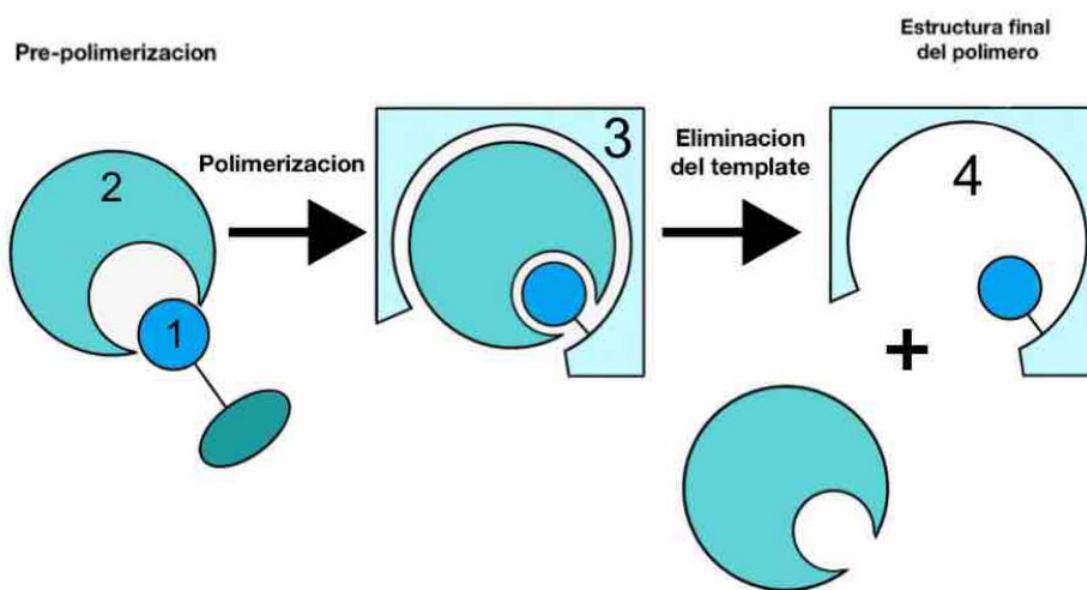


Figura 2. Síntesis de un MIP. 1) Monómero 2) Compuesto plantilla 3) Matriz del polímero 4) Cavidad selectiva

A continuación, se detallan las **características de los diferentes reactivos** que participan en el proceso de síntesis del MIP.

Compuesto plantilla o template

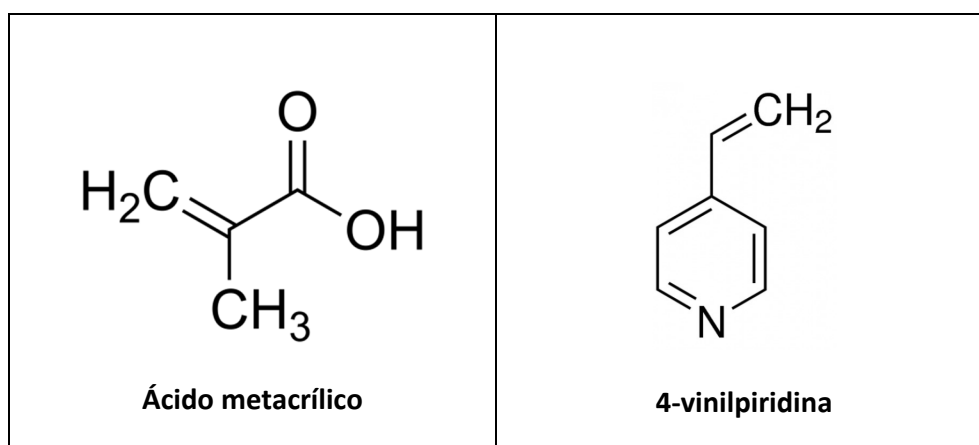
Entre la amplia variedad de compuestos que pueden ser utilizados como template en la preparación de un MIP se encuentran drogas, aminoácidos, hormonas, pesticidas, etc. La molécula seleccionada como compuesto plantilla puede ser el propio analito a determinar o una molécula estructuralmente muy parecida, con grupos funcionales y tamaño similares. En la elección del compuesto plantilla hay que tener en cuenta que las moléculas de gran tamaño encontrarán impedimentos estéricos mayores que las que tengan un menor tamaño.

Monómero funcional

El monómero se selecciona en función de las características y grupos funcionales del analito o compuesto plantilla con el cual ha de formarse el complejo de pre-polimerización. En este complejo, el analito y el monómero se enlazan a través de interacciones específicas de tipo ácido-base, fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno, de forma que se generan cavidades selectivas de gran afinidad.

Los monómeros funcionales más empleados en la preparación de los MIPs son moléculas con un grupo funcional con características ácido-base. Por ejemplo, los ácidos carboxílicos como el ácido metacrílico (MAA), o las bases heteroaromáticas débiles como el 4-vinilpiridina (4-VP), que se muestran en la Tabla 2, son monómeros muy habituales.

Tabla 2: Monómeros funcionales más empleados



En la Figura 3 se muestran las interacciones específicas que pueden darse en los huecos generados durante la polimerización, entre nuestro analito (el MCPA) y los monómeros MAA o 4-VP. Las interacciones específicas con el MAA se deben a la formación de puentes de Hidrógeno, mientras que las interacciones específicas con el 4-VP son de dos tipos: ácido-base entre el grupo ácido del MCPA y el nitrógeno de la piridina, y fuerzas de atracción de van der Waals entre los ciclos.

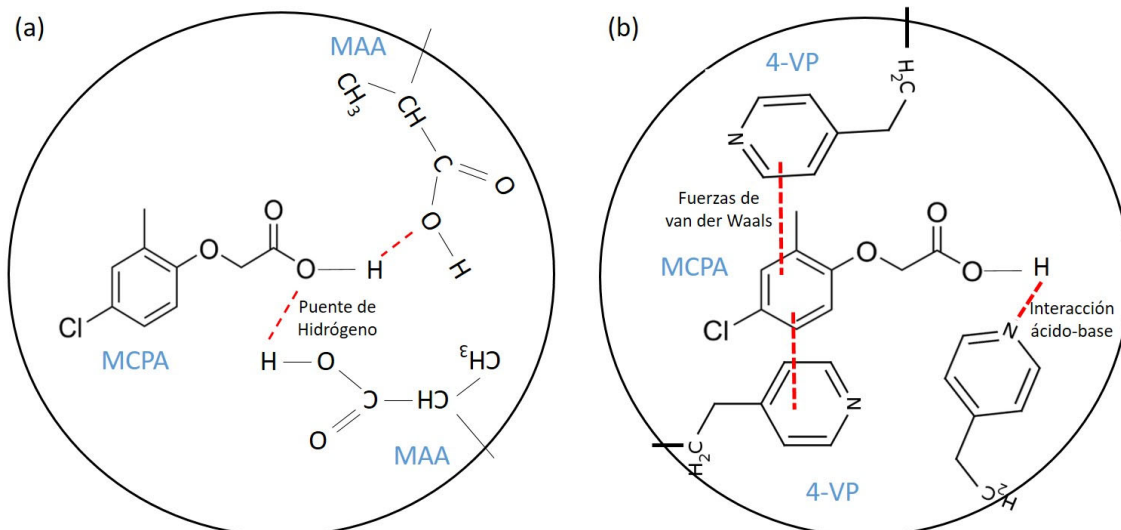


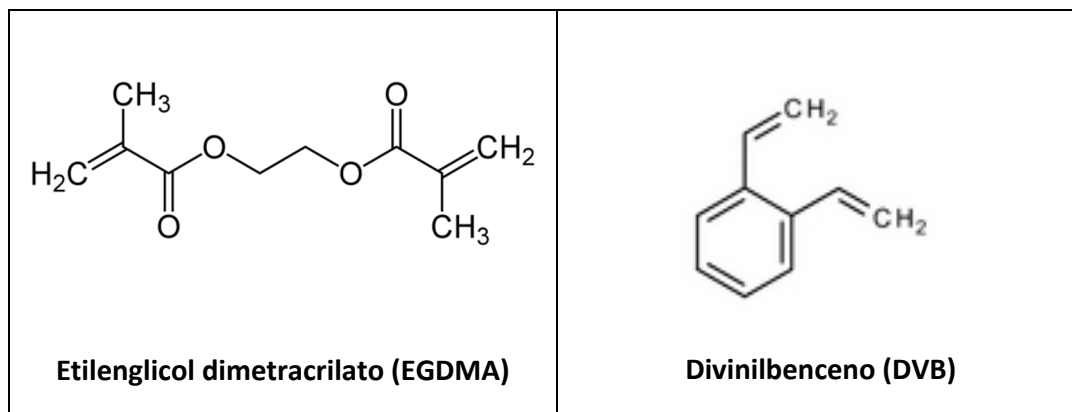
Figura 3. Interacciones específicas del MCPA (nuestro compuesto plantilla) en los huecos generados en el MIP empleando como monómero MAA (a) o 4-VP (b)

Agente entrecruzante o crosslinker

El agente entrecruzante, que ha de ser soluble en la mezcla de polimerización, se encarga de unir cadenas de monómero entre sí formando el entramado tridimensional de la red polimérica. El entrecruzante da estabilidad a la estructura del polímero y a los sitios donde se enlaza el compuesto plantilla con el monómero.

Existe una gran cantidad de agentes entrecruzantes, cuya característica principal es que poseen dos grupos etileno, al inicio y al final de su estructura, para poder enlazarse a las cadenas de monómeros por ambas partes. El etilenglicol dimetracrilato (EGDMA) o el divinilbenceno (DVB) son de los entrecruzantes más utilizados (Tabla 3).

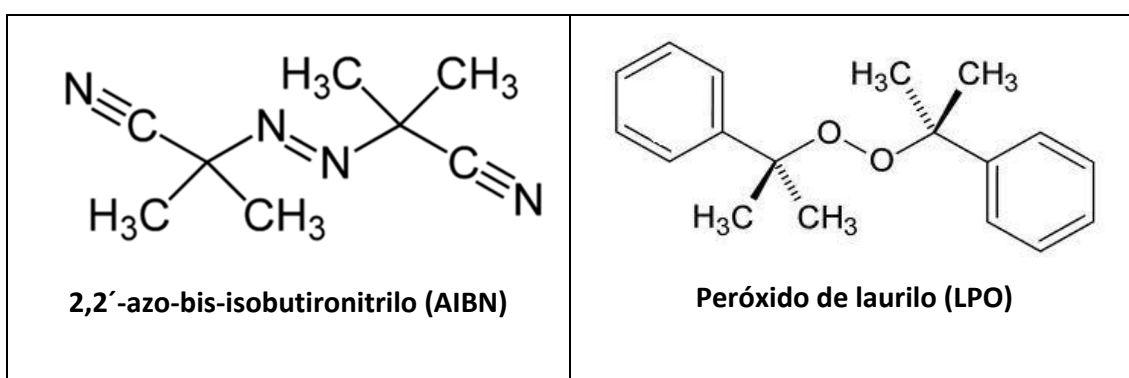
Tabla 3: Estructura de los entrecruzantes EGDMA y DVB



Iniciador

Para que comience la polimerización es necesaria la presencia de un agente iniciador, una especie muy reactiva que genera radicales libres, y la iniciación puede ser térmica o fotoinducida por luz UV. Uno de los iniciadores más utilizados es el 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), el cual se descompone rápidamente en radicales libres tanto por la radiación UV, como por calor cuando la temperatura es superior a 60°C. Otros iniciadores como el peróxido de laurilo (LPO), generan radicales libres sólo por la acción de la luz UV. Las estructuras del AIBN y el LPO se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Estructura de los iniciadores AIBN y LPO



Disolvente porogénico o porógeno

En primer lugar, el porógeno ha de ser capaz de solubilizar al compuesto plantilla, el iniciador, el monómero funcional y el entrecruzante. El porógeno es en parte responsable de la estructura final del polímero, ya que se elimina al lavar el polímero dejando poros más o menos grandes en su estructura, que deberán proporcionar permeabilidad suficiente para asegurar las propiedades de intercambio del polímero. Por otra parte, el porógeno debe poseer baja polaridad para reducir las interferencias durante la formación del complejo de pre-polimerización plantilla-monómero, de forma que el polímero generado tenga una alta selectividad. Así, los porógenos con una muy baja constante dieléctrica, serán ideales para la polimerización, como es el caso del tolueno, el acetonitrilo o el diclorometano.

1.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

1.4.1. PRINCIPIOS BÁSICOS

La cromatografía líquida es una técnica de análisis que permite la separación de los componentes de una mezcla para su posterior detección y cuantificación. La separación de dichos componentes en el sistema cromatográfico se basa en la interacción de los compuestos entre dos fases: la fase estacionaria, habitualmente empaquetada en columnas

y que se encuentra fija en el sistema; y la fase móvil, que fluye constantemente durante el análisis (D.A. Skoog, J.J. Leary, 1994).

En la cromatografía líquida clásica, o convencional, la fase estacionaria se inmovilizaba en columnas abiertas y la fase móvil fluía a través de la columna por gravedad. La separación de los componentes de la mezcla podía conseguirse, aunque con una eficacia baja. Posteriormente, se desarrolló la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de una bomba que ejerza elevadas presiones que permitan el paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria. En el paso de la cromatografía convencional a la cromatografía líquida de alta resolución, se redujo el tamaño de las partículas que constituyen la fase estacionaria, pasando de partículas de 150 μm a otras de entre 3 y 5 μm , aumentándose así la superficie de contacto. El aumento de la velocidad de flujo, gracias a la bomba de alta presión, así como el aumento de la superficie de contacto de la fase estacionaria proporcionaron grandes mejoras en la eficacia de las separaciones.

En cromatografía, la separación de los compuestos de la mezcla se realiza gracias a las interacciones de éstos con las fases móvil y estacionaria, interacciones que pueden ser de adsorción, reparto, intercambio iónico o en función del tamaño molecular.

1.4.2. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO

En la cromatografía de reparto el analito se distribuye atendiendo a su polaridad entre la fase móvil y la fase estacionaria, y es el tipo de cromatografía más ampliamente utilizado. Se puede dividir en cromatografía líquido-líquido y cromatografía de fase enlazada, o con fases unidas químicamente; la diferencia entre estas técnicas se basa en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno.

La cromatografía líquido-líquido presenta una fase estacionaria líquida que se retiene sobre la superficie de las partículas sólidas por adsorción física. El líquido de la fase estacionaria se va perdiendo por el efecto del paso del líquido de la fase móvil, que acaba arrastrando a la fase estacionaria. Por ello, el uso este tipo de cromatografía ha ido disminuyendo.

La cromatografía de fase enlazada es la más habitual. En ella, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie de las partículas sólidas. En este caso, la fase móvil no arrastrará a la fase estacionaria. Se utilizan partículas de sílice (de entre 3,5 y 10 μm) resistentes, porosas y uniformes. Además, sobre las partículas se enlazan químicamente grupos de diferente naturaleza, dando lugar a la cromatografía en fase inversa y fase normal, en función de la polaridad de la fase móvil y de los grupos enlazados en la fase estacionaria (D.A. Skoog, J.J. Leary, 1994).

En la cromatografía en fase inversa, los grupos enlazados de la fase estacionaria son apolares (hidrocarburos de cadena larga como C18 o C8), y la fase móvil es relativamente polar. Por tanto, el componente de la mezcla que sea más polar será el que eluya primero.

En la cromatografía en fase normal, al contrario que en la inversa, los grupos enlazados de la fase estacionaria son muy polares (agua, o trietilenglicol) y la fase móvil es apolar. Por tanto, el componente menos polar será el que eluya en primer lugar.

En este proyecto se ha empleado la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

1.4.3. INSTRUMENTACIÓN

Los componentes básicos de un sistema HPLC están representados en el esquema de la Figura 4.

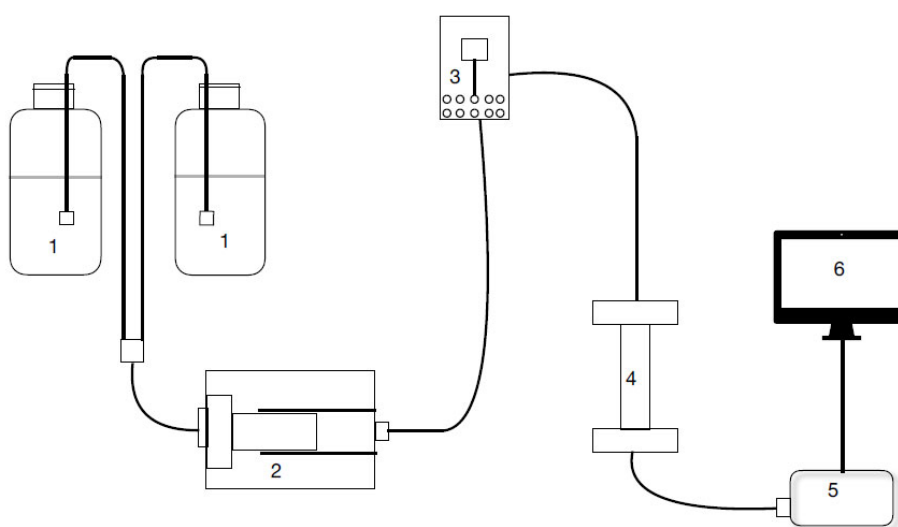


Figura 4: Componentes básicos de un sistema HPLC. 1) Recipientes con los disolventes de la fase móvil 2) Bomba de alta presión 3) Sistema de introducción de la muestra 4) Columna cromatográfica 5) Detector 6) Sistema de recogida de datos

Es necesario que los materiales usados para HPLC permitan el trabajo a presiones elevadas y sean resistentes a los posibles ataques de las sustancias utilizadas para la fase móvil, que suelen ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos. Por tanto, todas las conexiones del sistema deben ser de teflón o de acero inoxidable pasivado con ácido nítrico 6M, resistente a sustancias químicas activas.

A continuación, se detallan algunas **características de los distintos componentes del sistema HPLC.**

Fase móvil y modos de elución

Para el almacenamiento de la fase móvil se utilizan recipientes inertes para evitar que los disolventes extraigan especie alguna del material donde se almacenan. Normalmente se emplean como recipientes botellas de vidrio, y la fase móvil pasa a la bomba a través de tubos de teflón provistos de un sistema de filtros para eliminar cualquier partícula que pueda tener la fase móvil.

Los disolventes que se usan para la fase móvil son: agua, disoluciones tampón o disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo o diferentes mezclas). Todos ellos deben ser puros, estar exentos de partículas sólidas y desgasificados. La desgasificación se realiza mediante ultrasonidos o burbujeo con un gas inerte, como puede ser el nitrógeno, técnica que reduce la posibilidad de formación de burbujas en las válvulas y detectores, y evita la interferencia del oxígeno si la detección es fluorimétrica. El equipo cromatográfico incorpora también un desgasificador para facilitar también la eliminación de burbujas que se puedan formar mientras se está trabajando.

En la elución se consigue la extracción de los analitos retenidos en la fase estacionaria. Existen dos modos de elución: la elución isocrática, que permite la separación de mezclas utilizando una fase móvil de composición constante, es decir, que no cambia con el tiempo; y la elución en gradiente, en la que la composición de la fase móvil cambia a lo largo del tiempo, consiguiendo aumentar la eficacia de la separación.

Sistemas de bombeo

Los sistemas de bombeo en HPLC requieren las siguientes características:

- Estar contruidos con materiales inertes
- Suministrar un flujo de fase móvil libre de pulsaciones, en el margen comprendido entre 0,1 y 10 mL/min con una precisión del 0,5%
- Generar presiones de hasta 400-600 bar

Fase estacionaria

La fase estacionaria más habitual en cromatografía líquida en fase inversa es una fase C18, que consiste en un sólido constituido por partículas de sílice de entre 3-5 μm a las que se ha unido una cadena hidrocarbonada de 18 carbonos. La fase estacionaria está contenida en un tubo de acero inoxidable que puede tener diferentes longitudes (habitualmente entre 10-25 cm) y diámetro interno (habitualmente 4.6 cm).

Sistema de introducción de la muestra

Los sistemas de introducción de muestra pueden ser:

- Manuales: consisten en una válvula de inyección provista de un loop con un determinado volumen de inyección
- Automáticos: consisten en una jeringa de inyección automática que toma el volumen de inyección programado mediante el software. Las muestras se sitúan en viales en la gradilla del inyector, y la jeringa de inyección se desplaza para tomar el volumen del vial correspondiente.

En el equipo cromatográfico usado para este proyecto se dispone de un inyector automático. El volumen de inyección ha de ser pequeño para evitar la sobrecarga de la columna.

Detectores

Los detectores utilizados en HPLC deben tener las siguientes características:

- Ser sensible a pequeñas concentraciones de analito. Actualmente los detectores utilizados presentan límites de detección de entre 10^{-8} y 10^{-15} g/L de analito
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Dar una respuesta lineal amplia
- Tiempo de respuesta corto
- Alta fiabilidad y fácil de manejar
- Proporcionar respuestas similares para todos los analitos que constituyan la mezcla
- No ser destructivo con la muestra, de forma que ésta se pueda reutilizar

Los detectores han de ser capaces de registrar una señal (absorbancia, índice de reflexión, transmitancia, intensidad de fluorescencia, etc.) a lo largo del tiempo. Se usan dos tipos de detectores:

- Detectores basados en la propiedad del soluto: responden a propiedades del soluto o compuesto a determinar, como la absorbancia.
- Detectores basados en la propiedad de la disolución: responden a una propiedad de la fase móvil, como la constante dieléctrica o la densidad.

Entre los detectores basados en la propiedad del soluto, uno de los más utilizados es el detector UV-vis de fila de diodos, que registra el espectro de absorbancia en el UV-vis a lo largo del tiempo de análisis. En estos detectores se puede seleccionar una o varias longitudes de onda en las que el compuesto a determinar tenga una absorbancia máxima, de forma que el registro de señal con el tiempo se obtiene a esa longitud de onda concreta. El registro de señal a lo largo del tiempo del análisis se denomina cromatograma, y se detalla a continuación.

1.4.4. CROMATOGRAMA Y PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Un cromatograma (Figura 5) es un registro de la señal recogida por el detector de un sistema cromatográfico en función del tiempo a lo largo del proceso de medida. En el cromatograma, la señal registrada es constante a lo largo del tiempo mientras solo llega al detector el eluyente, y constituye la línea base del cromatograma. Cuando el analito se eluye y alcanza el detector, la señal registrada se modifica y aparece un pico. El cromatograma de la Figura 5 corresponde al análisis de una muestra que contiene un solo analito. (D.A. Skoog, J.J. Leary, 1994). En dicha figura, se resaltan los siguientes parámetros cromatográficos:

- El tiempo muerto, t_M , es el tiempo que tarda en llegar al detector una especie no retenida, por ejemplo el disolvente de la muestra, que suele ser del orden de 0.1-0.2 segundos.
- El tiempo de retención, t_R , es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el analito alcanza el detector
- El área de pico es el área contenida bajo la señal del pico del analito hasta la línea base. Este parámetro es el que se mide para realizar el análisis cuantitativo.

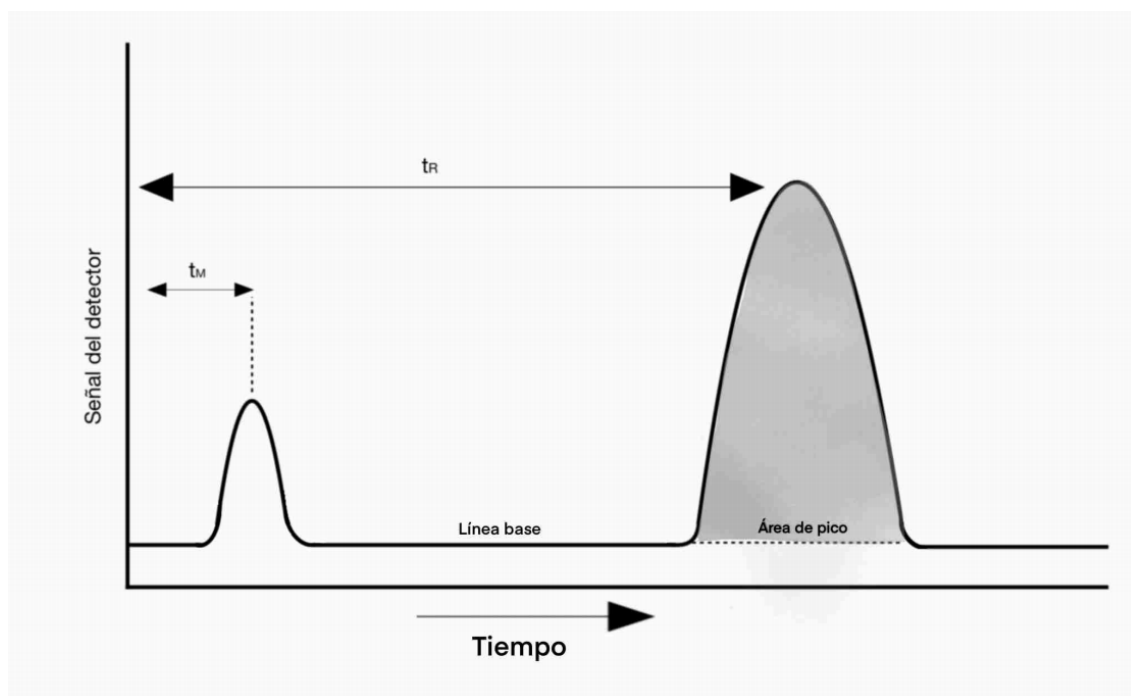


Figura 5: Cromatograma

De esta forma, en el cromatograma, aparecerán tantos picos como compuestos haya presentes en la mezcla que se desea separar.

2. CONTEXTO

Este trabajo fin de grado se enmarca en el proyecto de investigación “Sistemas de separación basados en nuevos polímeros porosos y composites polímero-nanopartículas con aplicaciones industriales y medioambientales” financiado por la Generalitat Valenciana, y el proyecto “Desarrollo de materiales poliméricos funcionales en plataformas flexibles para aplicaciones medioambientales y toxicológicas”, concedido recientemente en la convocatoria de 2018 de proyectos del Programa estatal de I+D+i orientada a los retos de la sociedad del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

3. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este Trabajo Fin de Grado son:

- Preparar polímeros de impronta molecular y los correspondientes polímeros sin impronta, para emplearlos como sorbentes en cartuchos para extracción en fase sólida
- Seleccionar el monómero más adecuado (MAA o 4-VP) para la extracción en fase sólida del plaguicida MCPA
- Comparar la capacidad de extracción de polímeros de impronta molecular con sus correspondientes polímeros sin impronta
- Estudiar la capacidad de preconcentración del plaguicida MCPA empleando los MIPs desarrollados
- Estudiar la capacidad de extracción de los MIPs para otros plaguicidas fenoxiácidos
- Aplicar los MIPs desarrollados para el análisis de los plaguicidas fenoxiácidos en muestras de agua

4. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

4.1. MATERIAL, REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los reactivos químicos empleados en la realización del proyecto son los siguientes:

- 4-vinilpiridina (4-VP)
- Acetonitrilo (ACN)
- Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético (MCPA)
- Ácido acético (ACH)
- Ácido 4(4-cloro-o-toliloxi) butírico (MCPB)
- Ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA)
- Ácido metacrílico (MAA)
- Azobisisobutironitrilo (AIBN)
- Diclorometano (CH₂Cl₂)
- Dimetilacrilato de etilenglicol (EDGMA)
- Fenoxaprop
- Haloxyfop
- Mecoprop (MCPP)
- Metanol (MeOH)
- N₂ (gas)
- Tolueno

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico o superior. Las disoluciones acuosas han sido preparadas utilizando agua MiliQ.

Se han preparado disoluciones madre de 1000 ppm de los plaguicidas 4-CPA, MCPA, MCPB, MCPP, Haloxyfop y Fenoxaprop en ACN. Estas disoluciones se conservan a 4°C. Las disoluciones diluidas de estos compuestos se preparan diariamente diluyendo la disolución madre en agua.

4.2. INSTRUMENTACIÓN

Los aparatos e instrumentos de laboratorio empleados en este trabajo han sido:

- Balanza analítica
- Baño de ultrasonidos de GT Sonic
- Colector de vacío para la extracción en fase sólida de Teknokroma
- Estufa de P Selecta
- Filtro de teflón (PFTE) de 0,22 µm
- pH metro de Crison
- Sistema de extracción *Soxhlet*

- Sistema de filtración a vacío
- Cromatógrafo de líquidos de Agilent Technologies, Modelo Infinity 1200 (Imagen 1) equipado con recipientes y tubería para la fase móvil, sistema desgasificador, bomba cuaternaria, inyector automático, columna Kinetex 2,6 μ m C18 100Å 10 cm x 4,6 mm, detector UV-vis de fila de diodos y sistema informático de recogida de datos.

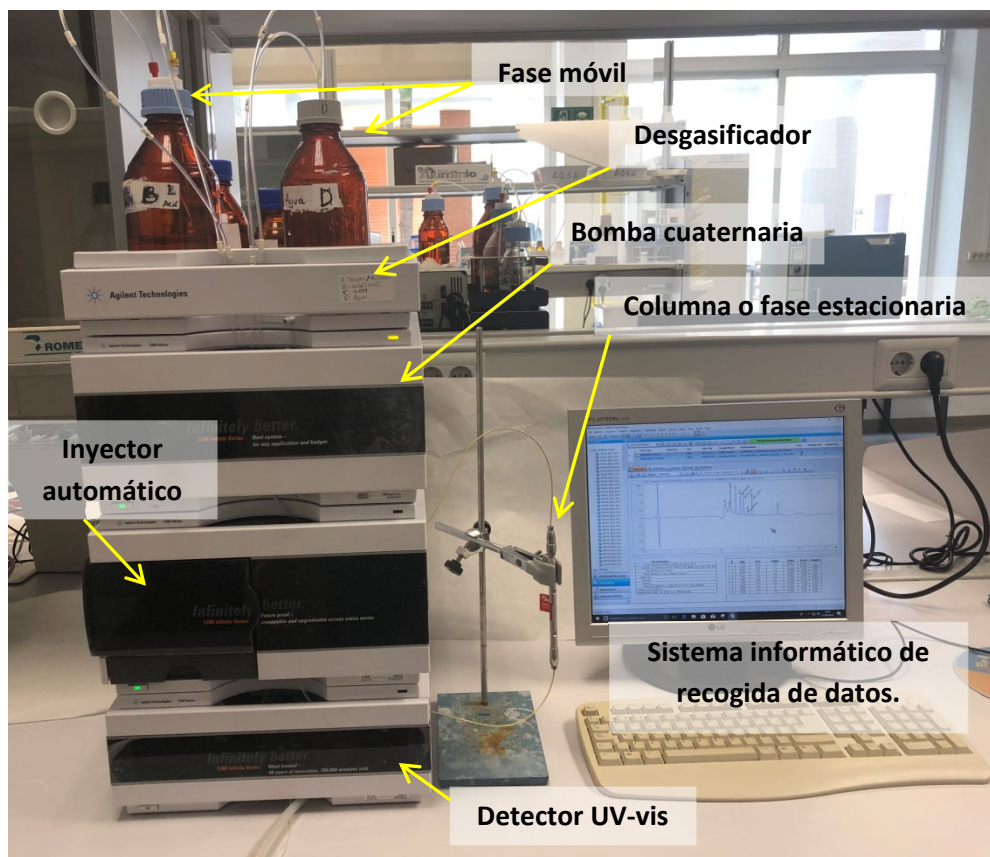


Imagen 1: Cromatógrafo de líquidos

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR Y SUS CORRESPONDIENTES POLÍMEROS SIN IMPRONTA

En este proyecto se han sintetizado polímeros de impronta molecular (MIPs) empleando como plantilla el plaguicida MCPA. Además, se han sintetizado sus correspondientes polímeros sin impronta (NIP), que no contienen el compuesto plantilla en la mezcla de polimerización.

En la preparación de las mezclas de polimerización para la síntesis de MIPs se emplea habitualmente una proporción plantilla:monómero:entrecruzante de 1:4:20. En este trabajo se emplea esta proporción en condiciones similares a las propuestas en la bibliografía para compuestos fenoxiácidos. (E. Herrero-Hernandez, R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, 2009)

Los MIPs y NIPs se han sintetizado empleando como agente entrecruzante el EGDMA, como porógeno el ACN o Tolueno según el caso, AIBN como iniciador, y 2 monómeros diferentes (MAA o 4-VP).

5.1.1. SÍNTESIS DE MIP Y NIP CON EL MONÓMERO MAA

PREPARACIÓN DEL MIP DE MAA

En la síntesis del MIP de MAA se ha preparado la siguiente mezcla de polimerización (tabla 5)

Tabla 5: Composición de la mezcla de polimerización del MIP de MAA

Compuesto (Función)	mmol	masa (g)
MCPA (plantilla)	0,200	0,0401
MAA (monómero)	0,800	0,0688
EGDMA (entrecruzante)	4,000	0,7929
AIBN (iniciador)	0,040	0,0066
total	5,04	0,9084

Porógeno	Volumen (mL)
ACN	6,00

Los componentes de la mezcla de polimerización se pesan en un vial de 15 mL situado en el interior de una balanza analítica. En primer lugar se pesan el compuesto plantilla (MCPA) y el monómero (MAA), añadiendo 1 mL del porógeno (ACN). La mezcla se deja en contacto 20 minutos para la creación del complejo de pre-polimerización. Transcurrido ese tiempo,

sobre la mezcla de pre-polimerización, se añaden el iniciador (AIBN), el entrecruzante (EGDMA) y 5 mL de ACN.

Posteriormente, para que los compuestos se mezclen correctamente, se ponen en ultrasonidos 3 minutos y después, se pasa N₂ durante 10 minutos para eliminar el oxígeno presente en la mezcla. Finalmente, para llevar a cabo el proceso de polimerización, se introduce el vial en la estufa a 60°C durante 24 horas.

PREPARACIÓN DEL NIP DE MAA

Para la síntesis del NIP de MAA se ha preparado la siguiente mezcla de polimerización (tabla 6) en ausencia del compuesto plantilla (MCPA):

Tabla 6: Composición de la mezcla de polimerización de NIP MAA

Compuesto (Función)	mmol	masa (g)
MAA (monómero)	0,800	0,0688
EGDMA (entrecruzante)	4,000	0,7929
AIBN (iniciador)	0,040	0,0066
total	4,84	0,8683

Porógeno	Volumen (mL)
ACN	6,00

Para la preparación de la mezcla de polimerización, en un vial y con la balanza analítica, se pesan el monómero (MAA), el iniciador (AIBN) y el entrecruzante (EGDMA), y se añaden 6 mL de ACN.

Posteriormente, la mezcla se pone en ultrasonidos 3 minutos y se pasa N₂ 10 minutos. Finalmente, el proceso de polimerización se lleva a cabo en la estufa a 60°C durante 24 horas.

5.1.2. SÍNTESIS DE MIP Y NIP CON EL MONÓMERO 4-VP

PREPARACIÓN DEL MIP DE 4-VP

El MIP de 4-VP se ha preparado en 2 condiciones diferentes:

- Empleando tolueno como porógeno (5 mL) y con un tiempo de contacto 4-VP-MCPA de 20 minutos en la mezcla de pre-polimerización. Este MIP lo llamaremos en adelante *MIP 4-VP Tolueno 20 min*

- Empleando ACN como porógeno (5 mL) y con un tiempo de contacto 4-VP-MCPA de 24 horas en la mezcla de pre-polimerización. Este MIP lo llamaremos en adelante *MIP 4-VP ACN 24h*

La composición final de la mezcla de polimerización es la misma en ambos casos (Tabla 7):

Tabla 7: Composición de la mezcla de polimerización de MIP 4-VP

Compuesto (Función)	Mmol	masa (g)
MCPA (plantilla)	0,200	0,0401
4-VP (monomero)	0,800	0,0688
EGDMA (entrecruzante)	4,000	0,7929
AIBN (iniciador)	0,04	0,0066
total	5,04	0,9084

Porógeno	ACN o Tolueno (5 mL)
-----------------	----------------------

El procedimiento de preparación de la mezcla y posterior polimerización, sigue los mismos pasos que el realizado con el MIP de MAA.

PREPARACIÓN DEL NIP DE 4-VP

El NIP de 4-VP se ha preparado en 2 condiciones diferentes, atendiendo al proceso descrito para el MIP:

- Empleando tolueno como porógeno (5 mL). Este NIP lo llamaremos en adelante *NIP 4-VP Tolueno*
- Empleando ACN como porógeno (5 mL). Este NIP lo llamaremos en adelante *NIP 4-VP ACN*

La composición final de la mezcla de polimerización es la misma en ambos casos (Tabla 8):

Tabla 8: Composición de la mezcla de polimerización de MIP 4-VP

Compuesto (Función)	mmol	masa (g)
4-VP (monomero)	0,800	0,0688
EGDMA (entrecruzante)	4,000	0,7929
AIBN (iniciador)	0,04	0,0066
total	4,84	0.8683

Porógeno	ACN o Tolueno (5 mL)
-----------------	----------------------

El procedimiento de preparación de la mezcla y posterior polimerización, sigue los mismos pasos que el realizado con el NIP de MAA.

5.2. LAVADO DE MIP y NIP

Tras la etapa de polimerización, se ha de realizar un lavado de los polímeros NIP y MIP.

El NIP no posee compuesto plantilla, pero tras la polimerización, se ha de lavar para eliminar los restos de porógeno, monómeros, iniciador, etc. que han quedado sin reaccionar. El sistema que se usa para el lavado es el sistema de filtración de disolventes de HPLC (Imagen 2), descrito a continuación.

Tras la polimerización del MIP, se ha de eliminar el compuesto plantilla además de los restos de reactivos de polimerización. Para ello, el polímero obtenido se lava con una disolución de MeOH:ACH 90:10 empleando el sistema de extracción *Soxhlet* (Imagen 3) descrito a continuación. Para asegurar el lavado del compuesto plantilla del MIP, se han de recoger diferentes fracciones de lavado e ir comprobando la presencia de MCPA en dichas fracciones. El proceso de lavado se ha de alargar hasta que ya no aparezca MCPA en la fracción de lavado del MIP. Para comprobar la presencia de MCPA en las fracciones, estas se analizan mediante HPLC con un método isocrático que se describirá más adelante.

5.2.1. SISTEMA DE FILTRACIÓN DE DISOLVENTES PARA HPLC

Como se ha comentado, el NIP se lava empleando el sistema de filtración de disolventes para HPLC (Imagen 2). Para el lavado, se emplean unos 100 mL de acetona, añadidos en pequeñas fracciones. El sistema de filtración empleado es totalmente de vidrio. Presenta, en la parte de arriba un recipiente donde se añade el disolvente de lavado. En la parte inferior hay un matraz para la recogida del líquido filtrado, donde también se encuentra la entrada para la bomba de vacío. Y en la parte central se pone un filtro de PTFE de 0.22 μm sobre el que se deposita el polvo del NIP.

Durante el lavado, con la ayuda de una espátula pequeña de metal, se agita la mezcla del NIP y la acetona. Se van añadiendo fracciones pequeñas del disolvente de lavado mientras se va agitando, hasta pasar un volumen total de disolvente de lavado de unos 100 mL.



Imagen 2: Sistema de filtración de disolventes para HPLC

5.2.2. SISTEMA DE EXTRACCIÓN SOXHLET

El sistema de extracción *Soxhlet* (Imagen 3) es un sistema de lavado eficaz para eliminar el compuesto plantilla del MIP. Consta de un sistema de recirculación del disolvente de lavado: el disolvente se encuentra en el matraz de fondo redondo, que se calienta mediante la manta calefactora hasta llegar a la ebullición. Cuando el disolvente pasa a estado gas, llega al refrigerante, por el que circula agua a temperatura ambiente, que lo enfría, de forma que condense el disolvente y se recoja en estado líquido en la cámara de extracción, dónde se encuentra el MIP dentro de la cápsula.

El disolvente que llega a la cámara de extracción lava el MIP, extrayendo el MCPA presente, y cuando se supera la altura del sifón, el disolvente con los restos del MCPA vuelve al matraz, quedando la cámara de extracción de nuevo vacía. En el matraz, el disolvente se vuelve a evaporar reiniciando el ciclo, y así repetidamente durante 24 horas. Para comprobar si se ha eliminado correctamente el compuesto plantilla, se recogen muestras de disolvente de la cámara de extracción cada cierto tiempo, hasta que no se detecta la presencia de MCPA.

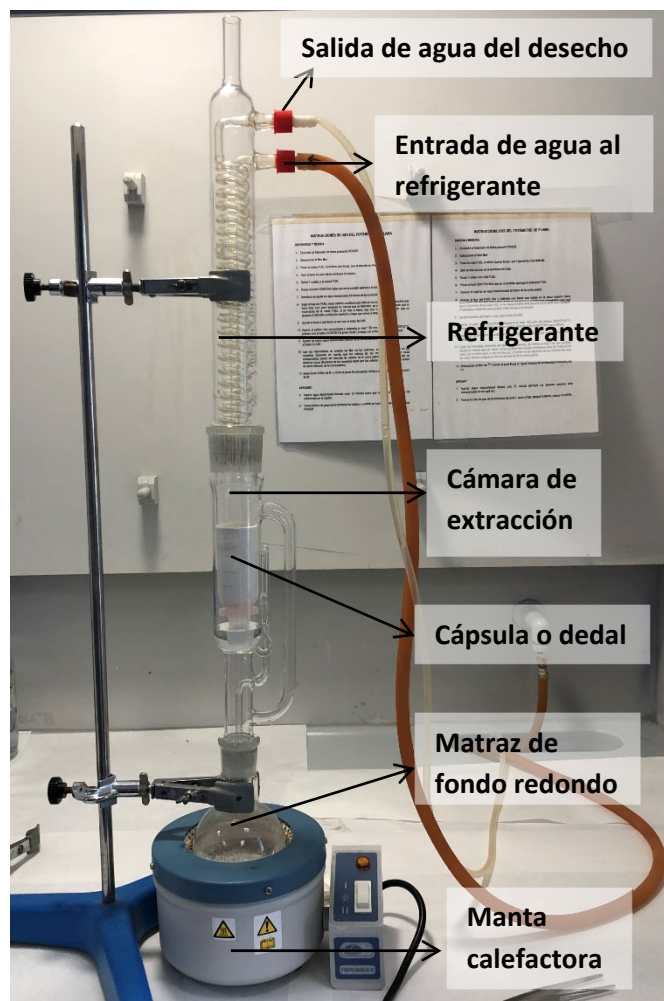


Imagen 3: Sistema de extracción Soxhlet

5.3. PREPARACIÓN DE LOS CARTUCHOS

Para la preparación de los cartuchos es necesario que, en primer lugar, el polímero que se va a utilizar como sorbente (MIP o NIP), esté seco. Por tanto, después del lavado, los polímeros se ponen en la estufa a 80°C durante 3-4 horas.

Una vez seco, el polímero se moltura con un mortero de cerámica hasta que se reduce a polvo. Después se pasa por un tamiz (tamaño de poro < 250 µm) y se recoge en un vial para el posterior empaquetado.

Para el empaquetado del sorbente en los cartuchos, se pesan en la balanza analítica 75 mg de sólido dentro del cartucho. El sólido se mantiene fijo dentro del cartucho porque está situado entre dos fritas (Imagen 4).



Imagen 4: Cartuchos de extracción

5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida del MCPA se lleva a cabo empleando el equipo de extracción que se muestra en la Imagen 5, siguiendo las etapas de acondicionamiento, carga, lavado, secado y elución, descritas en la introducción. El procedimiento de SPE aplicado ha sido diferente para los MIPs y NIPs sintetizados con el monómero MAA, y para los sintetizados con el monómero 4-VP.



Imagen 5: Sistema de extracción en fase sólida (SPE)

5.4.1. PROCEDIMIENTO PARA POLÍMEROS DE MAA

El procedimiento general de SPE para los polímeros de MAA es el siguiente:

1. Acondicionamiento: - 5 mL Acetonitrilo
- 5 mL MeOH:ACH 90:10
- 10 mL agua MiliQ
2. Carga: 5 mL de patrón de MCPA de 1 ppm
3. Lavado: 2,5 mL de disolvente de lavado
4. Secado: 15 min a vacío
5. Elución: 5mL de MeOH: ACH 90:10

Durante el procedimiento, se recogen las fracciones de carga, lavado o elución, y se filtran con filtros de jeringa de 0,22 micras de Teflón o de Nylon (dependiendo de si se trata de una fracción orgánica o acuosa respectivamente) para su posterior análisis en el sistema HPLC.

5.4.2. PROCEDIMIENTO PARA POLÍMEROS CON 4-VP

El procedimiento general de SPE para los polímeros de 4-VP es el siguiente:

1. Acondicionamiento: - 2,5 mL de MeOH
- 2,5 mL MeOH:ACH 90:10
- 15 mL agua MiliQ
2. Carga: 5 mL de patrón de MCPA de 1 ppm
3. Lavado: 2,5 mL de agua MiliQ
4. Secado: 15 min a vacío
5. Elución: 2mL de MeOH: ACH 90:10 y aforar en agua MiliQ el matraz hasta 5 mL

Durante el procedimiento, se recogen las fracciones de carga, lavado o elución, y se filtran con filtros de jeringa de 0,22 micras de Teflón o de Nylon para su posterior análisis en el sistema HPLC.

5.5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS: HPLC

El análisis del MCPA y compuestos de la familia, se ha llevado a cabo mediante dos programas de HPLC:

- uno isocrático, para el análisis individual del MCPA, que se ha empleado para analizar las fracciones de lavado del compuesto plantilla tras la etapa de polimerización de los MIPs, y para analizar las diferentes fracciones recogidas tras el procedimiento de SPE.
- y otro de gradiente, que se ha empleado para el análisis de las fracciones de SPE de la mezcla de 6 plaguicidas de la familia del MCPA.

5.5.1. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS INDIVIDUAL DEL MCPA

El análisis individual del MCPA mediante el sistema HPLC se lleva a cabo con el programa isocrático de 5 min, el cual presenta una fase móvil compuesta por H₃PO₄ 25 mM (55%): ACN (45%), con una velocidad de flujo $v=1$ mL/min, un volumen de inyección de 20 μ L, y una longitud de onda de 230 nm. Este programa de análisis se seleccionó tras ensayar diferentes proporciones H₃PO₄ 25 mM: ACN (60:40, 55:45, 50:50 y 40:60) como fase móvil, permitiendo analizar el MCPA en un tiempo corto.

5.5.2. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LA MEZCLA DE 6 PLAGUICIDAS DE LA FAMILIA DEL MCPA

Para el análisis de la mezcla de plaguicidas de la familia del MCPA se ha utilizado el programa de gradiente de 15 min descrito en la Tabla 9, en el cual la fase móvil va cambiando durante el análisis: la fase móvil se inicia con una composición de 20% ACN durante 4 min, cambia a 60% en 1 minuto, en 5 minutos más se aumenta el %ACN a 65%, y 1 minuto después, vuelve a las condiciones iniciales: 20% ACN. Para acabar, se mantiene en estas condiciones 5 minutos para estabilizar el sistema.

Tabla 9: Programa de gradiente para el análisis de 6 plaguicidas fenoxiácidos

Tiempo de análisis (min)	%H ₃ PO ₄ 25 mM	%ACN
0	80 %	20 %
4	80 %	20 %
5	40 %	60 %
9	35 %	65 %
10	80 %	20 %
15	80 %	20 %

En el programa cromatográfico, la velocidad de flujo de la fase móvil es de 1 mL/min, el volumen de inyección es de 20 μ L, y se registra la absorbancia a 230 nm. Este programa de separación, se tomó de un trabajo previo del grupo de investigación (S. Meseguer-Lloret, S. Torres-Cartas, M. Catalá-Icardo, C. Gómez-Benito., 2016).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ANÁLISIS INDIVIDUAL DEL MCPA Y ANÁLISIS DE LA MEZCLA DE 6 PLAGUICIDAS FENOXIÁCIDOS MEDIANTE HPLC

Análisis individual del MCPA

Cada día, se preparan 6 disoluciones patrón de MCPA entre 0,05-2 ppm y un blanco. Las disoluciones se inyectan en el cromatógrafo y se registra la absorbancia a 230 nm. Para cada patrón, en el cromatograma resultante (Figura 6), se mide el área de pico del MCPA.

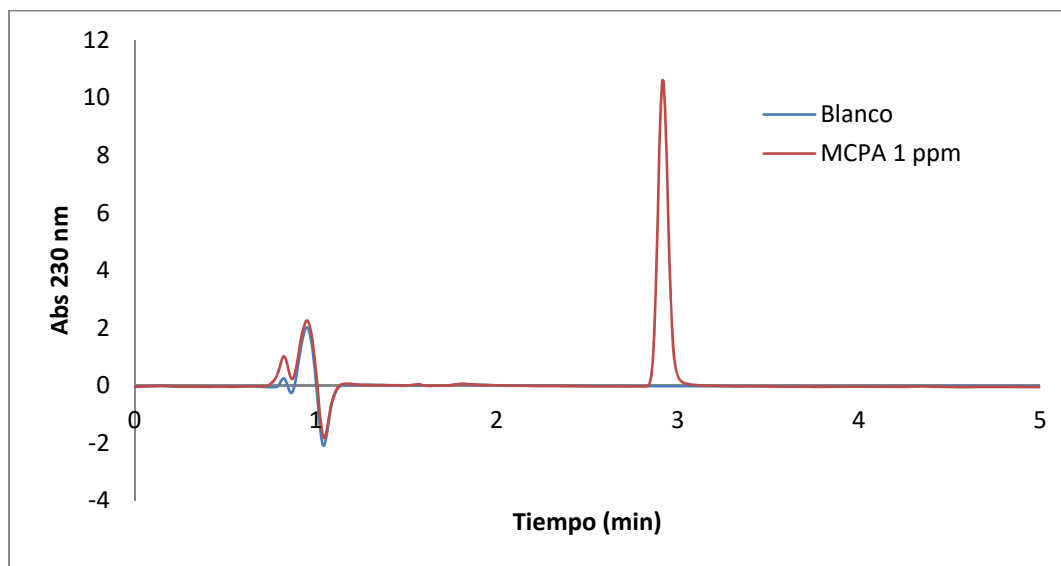


Figura 6: Cromatograma blanco y patrón de MCPA 1 ppm

A partir de las medidas de área de pico a $t_R = 2,91$ min, se obtiene la recta de calibrado lineal “Área de pico de MCPA” frente a “Concentración de MCPA (ppm)” (Figura 7).

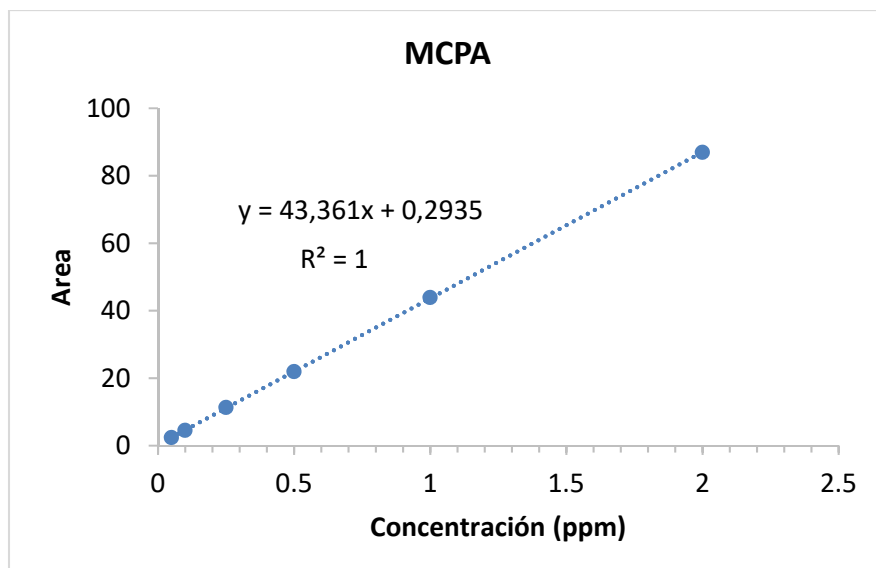


Figura 7: Área de pico de MCPA frente a Concentración de MCPA

Las fracciones extraídas en el procedimiento de SPE con los cartuchos desarrollados, se interpolarán en dichas rectas para obtener el %Recuperación de MCPA.

Análisis de la mezcla de 6 plaguicidas fenoxiácidos

En este caso, se preparan blanco y 6 disoluciones de mezclas de 6 plaguicidas fenoxiácidos (4-CPA, MCPA, MCPP, MCPB, Fenoxaprop y Haloxyfop) con concentraciones entre 0,05-2 ppm de cada plaguicida.

Las disoluciones se inyectan en el cromatógrafo y se registra la absorbancia a 230 nm a lo largo de todo el proceso. Para cada mezcla, en el cromatograma resultante (Figura 8), se mide el área de pico de cada uno de los plaguicidas.

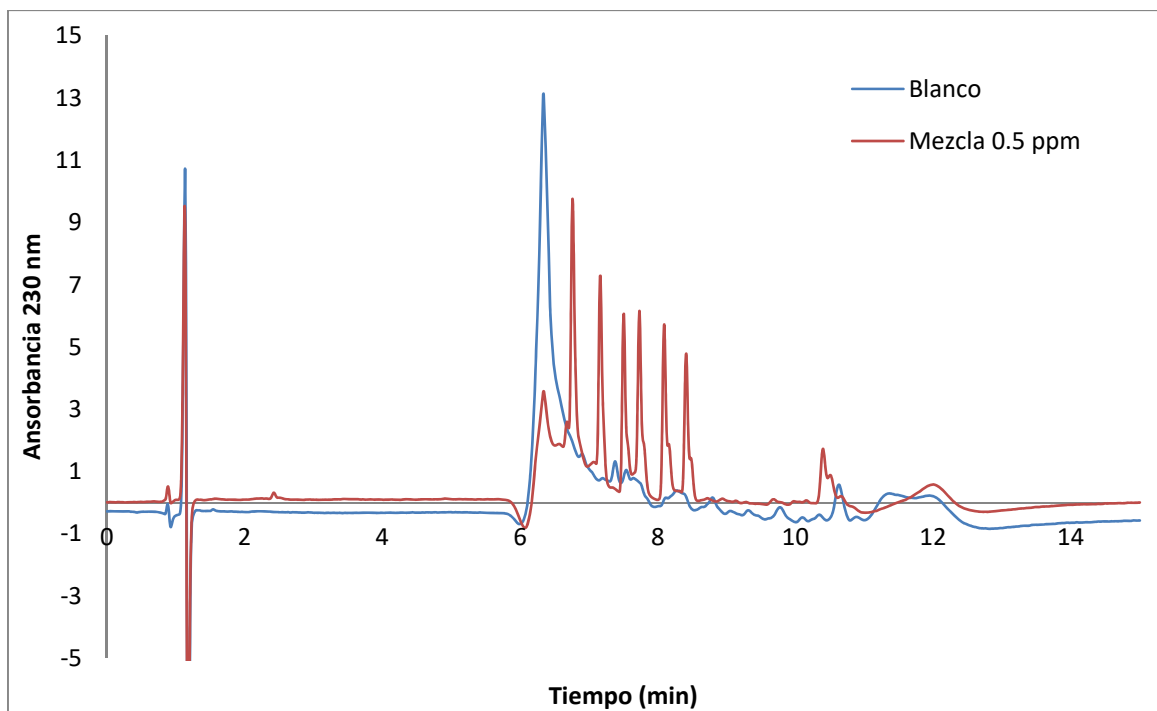


Figura 8: Cromatograma blanco y patrón de mezcla de 6 plaguicidas fenoxiácidos (4CPA, MCPA, MCPP, MCPB, Fenoxaprop, Haloxyfop) (Concentración: 0,5 ppm c/u)

La identificación de cada uno de los plaguicidas en el cromatograma para averiguar cuál de los picos corresponde a cada compuesto, se consigue inyectando por separado cada uno de los plaguicidas, y comparando los cromatogramas mezcla/compuesto individual. Los tiempos de retención de cada plaguicida se muestran en la Tabla 10.

A partir de las medidas de área de pico para cada plaguicida en la mezcla en las diferentes disoluciones, se obtiene la recta de calibrado lineal para cada uno, “Área de pico” frente a “Concentración (ppm)” (Tabla 10).

Las fracciones extraídas en el procedimiento de SPE con los cartuchos desarrollados, se interpolarán en dichas rectas para obtener el %Recuperación para cada plaguicida.

Tabla 10: Tiempos de retención y rectas de calibrado para cada uno de los 6 plaguicidas fenoxiácidos

Compuesto	t _R (min)	Recta de calibrado Area de pico frente a Concentración (ppm)
4CPA	6,791	Area = 53,0·C + 5,62 R ² = 0,9958
MCPA	7,194	Area = 50,5·C - 1,33 R ² = 0,9997
MCPP	7,535	Area = 47,0·C - 0,431 R ² = 0,9967
MCPB	7,766	Area = 49,0·C + 10,2 R ² = 0,9873
Fenoxaprop	8,127	Area = 25,9·C + 1,46 R ² = 0,9933
Haloxypop	8,449	Area = 43,0·C - 0,589 R ² = 0,9979

6.2. ESTUDIO CON MIP Y NIP DE MAA PARA MCPA

Los primeros polímeros que se prepararon fueron los MIP y NIP de MAA. Con ellos, se ha realizado el proceso de SPE descrito anteriormente, y se ha procedido al análisis individual del MCPA en las diferentes fracciones de extracción: carga, lavado y elución.

El lavado es una etapa clave en la extracción, porque se pueden dar pérdidas del compuesto. Es de esperar que existan unas condiciones de lavado en las que el MCPA se pierda al emplear el NIP ya que no existen interacciones específicas. Si la huella que ha dejado el MCPA en el MIP funciona, tras la etapa de lavado de SPE el MCPA quedará retenido, lo que implicaría una destacada selectividad para el polímero MIP desarrollado.

Por ello, se han ensayado 3 condiciones de lavado diferentes, empleando 2,5 mL de agua, ACN o diclorometano.

6.2.1. SPE CON MIP Y NIP DE MAA: ETAPA DE LAVADO DE SPE CON AGUA

El procedimiento empleado es el explicado en el apartado 5.4.1. Los porcentajes de recuperación de MCPA en las fracciones de carga, lavado y elución empleando los MIPs (Tabla 11) y NIPs (Tabla 12) de MAA se muestran a continuación en las tablas.

Tabla 11: SPE del MCPA con el MIP MAA lavando con agua

Fracción de SPE MIP MAA	%Recuperación \pm Desviación estándar (%Rec \pm s)
Carga	15 \pm 9
Lavado con agua	25 \pm 4
Elución	60 \pm 4
	%Rec total = 100

Tabla 12: SPE del MCPA con el NIP MAA lavando con agua

Fracción de SPE NIP MAA	%Rec \pm s
Carga	15 \pm 8
Lavado con agua	20 \pm 6
Elución	65 \pm 2
	%Rec total = 100

En los procesos de SPE, interesa que no haya pérdidas en la etapa de carga y lavado, y que el compuesto se recupere por completo en la etapa de elución. De este estudio se deduce que en la etapa de carga, se pierde parte del MCPA, lo mismo en el MIP que en el NIP, cerca de un 15%. Igual sucede en la etapa de lavado, en la que se pierde entre un 20 y 25%. Y el porcentaje de MCPA restante, entre el 60 y 65%, se extrae en la etapa de elución. En estas condiciones, el MIP y el NIP tienen un comportamiento similar.

Tanto con el MIP como con el NIP se recupera todo el MCPA al sumar la recuperación de las tres fracciones, pero las pérdidas en las etapas de carga y lavado hacen que el proceso no sea adecuado.

6.2.2. SPE CON MIP Y NIP DE MAA: ETAPA DE LAVADO CON ACN

El procedimiento empleado es el explicado en el apartado 5.4.1., pero en este caso, la etapa de lavado de SPE se ha hecho con 2,5 mL de ACN. Al igual que en el estudio anterior, se han recogido y analizado las fracciones de las etapas de carga, lavado y elución para comprobar el funcionamiento de los MIPs (Tabla 13) y NIPs (Tabla 14).

Tabla 13: SPE del MCPA con el MIP MAA lavando con ACN

Fracción de SPE MIP MAA	%Rec ± s
Carga	3 ± 3
Lavado con ACN	86 ± 3
Elución	11 ± 1,1
	%Rec total =100

Tabla 14: SPE del NIP MAA lavando con ACN

Fracción de SPE MIP MAA	%Rec ± s
Carga	10 ± 9
Lavado con ACN	85 ± 10
Elución	1,4 ± 0,1
	%Rec total = 96,4

En este caso, en la etapa de carga, el MIP pierde menos MCPA que el NIP, 3% y 10% respectivamente. En la etapa de lavado, el ACN arrastra una gran fracción de MCPA tanto en el MIP como en el NIP, cerca del 85%. En la elución, el MIP recupera el 10% de MCPA restante, y el NIP recupera el 1,4% restante. Los resultados indican que el MIP retiene algo más al MCPA, lo cual es lo esperado al tener el MIP la huella del compuesto en su estructura, pero en ambos casos se pierde una elevada fracción de MCPA en el lavado, lo que hace que el proceso no sea adecuado.

6.2.3. SPE CON MIP Y NIP DE MAA: ETAPA DE LAVADO CON DICLOROMETANO

El procedimiento empleado es el explicado en el apartado 5.4.1., pero en este caso, la etapa de lavado de SPE se ha hecho con 2,5 mL de diclorometano. Se han recogido solo las fracciones de carga y elución, ya que el disolvente empleado para el lavado, el diclorometano, no es miscible con la fase móvil del sistema HPLC, lo que causaría problemas de inestabilidad en el sistema de medida.

Los porcentajes de recuperación de MCPA en la fracción de carga fue de 7 ± 3 % con el MIP, y de 7 ± 2 % con el NIP. En la fracción de elución no se recupera nada de MCPA, por lo que se deduce que el diclorometano ha arrastrado todo el MCPA en la etapa de lavado. Por ello, este proceso tampoco resulta adecuado para la extracción del MCPA.

6.3. ESTUDIO CON MIP Y NIP DE 4-VP TOLUENO 20 MIN PARA MCPA

En segundo lugar, se prepararon los MIP y NIP de 4-VP empleando tolueno como porógeno y 20 minutos de tiempo de contacto para el complejo de pre-polimerización MCPA-4-VP. Con estos cartuchos, se ha realizado el proceso de SPE descrito anteriormente (apartado 5.4.2.), y se ha procedido al análisis individual del MCPA en las diferentes fracciones de extracción: carga, lavado y elución.

Ya se ha comentado que el lavado es una etapa clave en la extracción, porque al emplear el NIP se pueden dar pérdidas del compuesto que no se producen al emplear el MIP (que sí posee interacciones específicas). Por ello, se han ensayado 6 condiciones de lavado diferentes:

- Lavado con 2,5 mL de diclorometano
- Lavado con 2,5 mL de tolueno
- Lavado con 2,5 mL de agua
- Lavado con 2,5 mL de mezclas MeOH:agua en diferentes proporciones
- Lavado con 2,5 mL de mezclas ACN:agua en diferentes proporciones
- Carga y lavado con agua a diferentes pHs

6.3.1. SPE CON MIP y NIP DE 4-VP TOLUENO 20 MIN: ETAPA DE LAVADO CON DICLOROMETANO

El estudio de extracción del MCPA se ha hecho con MIP y NIP, y los ensayos se han realizado por triplicado.

El procedimiento de SPE empleado es el explicado en el apartado 5.4.2., pero en este caso, la etapa de lavado de SPE se ha hecho con 2,5 mL de diclorometano. Se han recogido sólo las fracciones de carga y elución, ya que el diclorometano no es miscible con la fase móvil del sistema HPLC.

En este estudio, en la etapa de carga no se escapa nada de MCPA ni al emplear el MIP ni el NIP. Y en la fracción de elución, se recupera un $94 \pm 3\%$ del MCPA con el MIP y un $92 \pm 1,5\%$ con el NIP. Así que empleando diclorometano como disolvente de lavado, la extracción del MCPA es completa, pero no existen diferencias entre el NIP y el MIP.

6.3.2. SPE CON MIP Y NIP DE 4-VP TOLUENO 20 MIN: ETAPA DE LAVADO CON TOLUENO

El estudio de extracción del MCPA se ha hecho con MIP y NIP, y los ensayos se han realizado por triplicado.

El procedimiento empleado es el explicado en el apartado 5.4.2., pero en este caso, la etapa de lavado de SPE se ha hecho con 2,5 mL de tolueno. Se decidió no recoger la fracción de carga, ya que del estudio anterior se deduce que no hay pérdidas de MCPA en esta etapa.

Tampoco se recogió la etapa de lavado, ya que el tolueno no es miscible con la fase móvil del sistema HPLC.

La recuperación de MCPA en la etapa de elución fue un 96 ± 2 % con el MIP y un $98,2 \pm 0,8$ % con el NIP. Por tanto, se ha demostrado que lavando con tolueno se extrae todo el MCPA sin pérdidas, pero seguimos sin tener diferencias entre la capacidad de extracción de MIP y NIP.

6.3.3. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE LAVADO CON AGUA

En este caso solo se ha realizado la extracción utilizando el NIP, y por triplicado. El procedimiento de SPE es el explicado en el apartado 5.4.2. Y se han recogido y analizado las fracciones de carga, lavado y elución. El porcentaje de recuperación de MCPA en las distintas fracciones se muestra en la tabla 15.

Tabla 15: SPE del MCPA con el NIP 4-VP TOLUENO lavando con agua

Fracción de SPE NIP 4-VP Tol. 20 min	%Rec \pm s
Carga	0
Lavado con agua	$0,2 \pm 0,3$
Elución	102 ± 4
	%Rec total = 102,2

En la etapa de carga no se pierde MCPA, y tampoco en la etapa de lavado con agua; en la etapa de elución, se recupera todo el MCPA. Por lo tanto, si con el NIP se recupera todo, no tiene sentido realizar la extracción con el MIP, porque no se espera que funcione peor. El NIP es un buen sorbente para el MCPA, pero no existe el mecanismo de selectividad adicional que proporcionan los huecos.

En cualquier caso, se continuará probando otras condiciones de lavado con el NIP.

6.3.4. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE LAVADO CON MeOH:AGUA EN DIFERENTES PROPORCIONES

En este caso, también se ha utilizado para el SPE únicamente el NIP (ensayos por duplicado), y el procedimiento es el explicado en el apartado 5.4.2., lavando con 2,5 mL de MeOH:Agua en diferentes proporciones: 10%, 25%, 40%, 80% y 100% MeOH. Se han recogido las fracciones de lavado y elución, porque en la carga no se espera perder MCPA.

En la Tabla 16 se muestran los %Rec del MCPA en las etapas de lavado y elución en las diferentes condiciones ensayadas.

Tabla 16: SPE del MCPA con el NIP 4-VP Tolueno lavando con MeOH:Agua en diferentes proporciones

%MeOH:Agua en la etapa de lavado	Fracción recogida	%Rec
10:90	Lavado	1.2
10:90	Elución	98
25:75	Lavado	2
25:75	Elución	98
40:60	Lavado	3
40:60	Elución	98
80:20	Lavado	4
80:20	Elución	100
100:0	Lavado	2
100:0	Elución	101

En todos los ensayos se observa que en el lavado prácticamente no se pierde MCPA y en la fase de elución se recupera todo el MCPA. Por tanto, el MeOH no servirá como disolvente de lavado, porque no es capaz de quitar las interacciones no específicas entre el NIP y el MCPA.

6.3.5. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE LAVADO CON ACN:AGUA EN DIFERENTES PROPORCIONES

Como en el apartado anterior, en este estudio sólo se ha utilizado el NIP, y el procedimiento es el explicado en el apartado 5.4.2., lavando con 2,5 mL de ACN:Agua en diferentes proporciones: 10%, 25%, 40%, 60% y 100% ACN. Se han recogido y analizado las fracciones de lavado y elución.

En la Tabla 17 se muestran los %Rec del MCPA en las etapas de lavado y elución en las diferentes condiciones ensayadas.

Se deduce de los resultados de la extracción que prácticamente no se pierde MCPA en la etapa de lavado (entre 1–2%). En la fracción de elución, en general, se recupera cuantitativamente el MCPA, entre un 88-96%. Por ello, se concluye que el ACN tampoco es el disolvente de lavado adecuado para sacar el MCPA del NIP, ya que en general no elimina las interacciones no específicas MCPA-NIP.

Tabla 17: SPE del MCPA con el NIP 4-VP Tolueno lavando con ACN:Agua en diferentes proporciones

%ACN:Agua en la etapa de lavado	Fracción recogida	%Rec \pm s
10:90	Lavado	1,2
10:90	Elución	97
25:75	Lavado	2
25:75	Elución	91
40:60	Lavado	2
40:60	Elución	92
60:40	Lavado	2
60:40	Elución	88
80:20	Lavado	7
80:20	Elución	89
100:0	Lavado	1,2
100:0	Elución	96

6.3.6. SPE CON NIP DE 4-VP TOLUENO: ETAPA DE CARGA Y LAVADO A DIFERENTES pHs

En este caso también se ha utilizado solo el NIP, y el procedimiento de SPE es similar al explicado en el apartado 5.4.2. La etapa de carga del MCPA se ha realizado a diferentes pHs (3, 5, 7 y 9) y también el lavado se ha realizado a los mismos pHs. En todos los casos se han recogido y analizado las fracciones de lavado y elución (Tabla 18).

Tabla 18: SPE del MCPA con el NIP 4-VP Tolueno: etapas de carga y lavado a diferentes pHs

pH de la etapa de carga y lavado	Fracción recogida	%Rec
3	Lavado	0,8
3	Elución	91
5	Lavado	0,6
5	Elución	92
7	Lavado	0,6
7	Elución	95
9	Lavado	0,7
9	Elución	102

El estudio del pH de carga y lavado, demuestra que no se escapa el MCPA en ninguno de los pHs estudiados, ni en la carga ni en el lavado, y en la elución se recupera el MCPA entre un 91 y un 102%.

El NIP sigue dando buenos resultados, por tanto, seguimos sin tener una condición en la que el NIP pierde el MCPA. Si el NIP recupera bien al MCPA, no tiene sentido estudiar la extracción con el MIP, porque se espera que los resultados sean similares.

Las interacciones del NIP con el MCPA son fuertes, ya que la retención es muy buena, pero no son selectivas al no haber huecos específicos. Por ello, se decide preparar sorbentes MIP y NIP cambiando ligeramente las condiciones de polimerización.

6.4. ESTUDIO CON MIP Y NIP DE 4-VP ACN 24 HORAS PARA MCPA

Dado que no se han demostrado interacciones específicas con el MIP y NIP de 4-VP Tolueno 20 minutos, se decide preparar sorbentes MIP y NIP de 4-VP empleando ACN como porógeno. El ACN disuelve bien al MCPA y al 4-VP, proceso que era menos favorable con tolueno, por lo que esperamos que la formación del complejo de pre-polimerización sea más efectiva. Además, en este caso, se ha aumentado el tiempo de contacto de la mezcla de pre-polimerización MCPA-4VP a 24 HORAS.

Con estos sorbentes, *MIP y NIP 4-VP ACN 24 HORAS*, se ha realizado el proceso de SPE descrito en el apartado 5.4.2., empleando dos condiciones de lavado (2,5 mL de diclorometano y 2,5 mL de agua), y se ha procedido al análisis individual del MCPA en las diferentes fracciones de extracción: carga, lavado y elución.

6.4.1. SPE CON MIP y NIP DE 4-VP ACN 24 HORAS: ETAPA DE LAVADO CON DICLOROMETANO

En este caso, se han recogido y analizado sólo las fracciones de carga y elución, ya que el diclorometano no es miscible con la fase móvil del sistema HPLC.

Con el NIP se pierde un $30 \pm 10\%$ de MCPA en la etapa de carga y se recupera un $47 \pm 9\%$ en la elución, por lo que calculamos que en el lavado se ha perdido cerca del 23%. Y en el caso del MIP, se pierde solo un $4 \pm 3\%$ de MCPA en la etapa de carga, y se recupera un $78 \pm 9\%$, por tanto, se calcula que se ha perdido un 18% en el lavado.

En este caso, el MIP recupera más que el NIP, lo que induce a pensar que ahora sí hay interacciones específicas en el MIP que hacen que el proceso de extracción sea más selectivo.

6.4.2. SPE CON MIP Y NIP DE 4-VP ACN 24 HORAS: ETAPA DE LAVADO CON AGUA

Dado que en el ensayo anterior, empleando diclorometano en la etapa de lavado de SPE, se perdía cerca de un 18% de MCPA en el lavado con el MIP, se realiza el SPE empleando Agua como disolvente de lavado. Se han recogido y analizado las fracciones de carga, lavado y elución de la extracción con los MIPs y con los NIPs (Tabla 19).

Tabla 19: SPE del MCPA con el MIP y el NIP 4-VP ACN 24 HORAS lavado con agua

Sorbente	Etapas de SPE	%Rec \pm s
MIP 4VP ACN 24h	Carga	4,1 \pm 0,9
MIP 4VP ACN 24h	Lavado	1,0 \pm 1,1
MIP 4VP ACN 24h	Elución	93 \pm 6
NIP 4VP ACN 24h	Carga	15 \pm 9
NIP 4VP ACN 24h	Lavado	0,78 \pm 0,06
NIP 4VP ACN 24h	Elución	80 \pm 11

Se deduce del estudio que con el MIP se pierde muy poco MCPA en la etapa de carga (4%) y en la etapa de lavado (<1%). La recuperación del MCPA es cuantitativa en la etapa de elución (93%). Por otro lado, el NIP pierde más MCPA que el MIP en la etapa de carga (14 \pm 9%), no pierde nada en el lavado con agua, y en la elución se recupera cerca del 80%. Los resultados con el NIP son además menos reproducibles, obteniéndose errores más grandes.

Estas condiciones de SPE, lavando con agua, son adecuadas para la extracción del MCPA, ya que se obtienen mejores recuperaciones con el MIP que con el NIP, demostrando de nuevo la selectividad del sorbente. Por lo tanto, se seleccionó el *MIP 4-VP ACN 24 HORAS* para realizar los siguientes estudios.

6.5. CAPACIDAD DE PRECONCENTRACIÓN DEL MIP 4VP ACN 24HORAS

La extracción en fase sólida permite preconcentrar el analito a determinar si se procesa una cantidad de muestra grande y se realiza la elución con una cantidad de disolvente pequeña. De esta manera, una concentración de analito inicial muy pequeña, no detectable, podría detectarse al aumentar la concentración final tras el proceso.

El factor de concentración (FC) puede calcularse como el "*Volumen de muestra procesada*" entre el "*Volumen de eluyente*". Por ejemplo, si se procesan en la etapa de carga 50 mL de muestra y en la etapa final se eluye el analito con 2 mL de disolvente, se tendría un factor de concentración de 25 (FC=50mL/2mL=25). Para que el FC sea el máximo posible tras el proceso de SPE, es conveniente procesar un volumen grande de muestra y eluir el compuesto mediante un volumen pequeño de disolvente, sin que haya pérdidas en la retención del compuesto a determinar.

Para estudiar la capacidad de preconcentración empleando el MIP 4-VP ACN 24 horas, se han realizado dos estudios:

- estudio del volumen y composición del eluyente, con la intención de seleccionar el mínimo volumen de eluyente que permita extraer el MCPA con recuperaciones cercanas al 100%.
- estudio del volumen de ruptura, con la intención de seleccionar el máximo volumen de muestra que se pueda procesar sin que haya pérdidas del MCPA en la retención.

6.5.1. ESTUDIO DEL VOLUMEN Y COMPOSICIÓN DEL ELUYENTE

Para establecer el volumen óptimo de eluyente con el *MIP 4VP ACN 24 HORAS* se ha realizado el SPE empleando 5 mL de patrón de MCPA en la etapa de carga, y un volumen total 5 mL de MeOH:ACH 90:10 en la etapa de elución transferido en 5 veces, usando 1 mL cada vez, para comprobar qué volumen de eluyente es necesario para recuperar todo el MCPA. Cada mL recogido se ha aforado a 5 mL con MeOH:ACH 90:10, de forma que no hay preconcentración tras el SPE. Los porcentajes de recuperación del MCPA con cada mL de eluyente se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Estudio del volumen del eluyente (MeOH:ACH 90:10) con el MIP 4-VP ACN 24 HORAS

Elución	%Rec \pm s
1ª Elución con 1 mL	87 \pm 2
2ª Elución con 1 mL	8,1 \pm 0,6
3ª Elución con 1 mL	2,0 \pm 1,7
4ª Elución con 1 mL	1,2 \pm 1,0
5ª Elución con 1 mL	1,8 \pm 1,3

El volumen óptimo de elución sería de 2 mL, puesto que en el primer mililitro se recupera un 87% y en el segundo un 8,1% del MCPA, lo que sumaría un total de 95.1% de MCPA recuperado. Se observa en la tabla que en las tres últimas eluciones se recupera entre un 1,2% y un 2% de MCPA, lo que se considera despreciable.

Una vez seleccionado el volumen óptimo de eluyente, se estudia su composición idónea para la elución cuantitativa del MCPA. Para ello se realiza el proceso de SPE empleando cuatro condiciones de elución diferentes:

- 2 mL de MeOH:ACH (90:10)
- 2 mL de MeOH:ACH (95:5)
- 2 mL de MeOH:ACH (99:1)
- 2 mL de Agua:ACH (90:10)

En cuanto a la relación MeOH:ACH (Tabla 21), la elución con MeOH:ACH (90:10) se considera la mejor, ya que la recuperación del MCPA es cuantitativa (95,8%). Por otra parte, se observa en estas condiciones menos dispersión de los resultados ($s=1.1$).

Tabla 21: Estudio de la composición del eluyente con el MIP 4-VP ACN 24 HORAS

Etapa	%Rec \pm s	%CV
Elución con 2 mL MeOH:ACH (90:10)	95,8 \pm 1,1	1.3%
Elución con 2 mL MeOH:ACH (95:5)	94 \pm 7	8%
Elución con 2 mL MeOH:ACH (99:1)	87 \pm 12	14%
Elución con 2 mL Agua:ACH (90:10)	3,0 \pm 2,8	93%

A partir de la desviación estándar y el valor medio de las recuperaciones puede calcularse el coeficiente de variación, ($\%CV=s*100/\text{valor medio}$), parámetro empleado habitualmente para estudiar la repetibilidad de las medidas. Cuanto más pequeño es el %CV, menor es la dispersión de los resultados y mejor es la repetibilidad. En la Tabla 21 aparecen los %CV en cada una de las condiciones ensayadas. Así, aunque la recuperación es similar con MeOH:ACH 90:10 o 95:5, se selecciona como óptima la primera condición al ser el %CV menor. En general, podemos decir que cuando se disminuye el porcentaje de ácido en el eluyente, la recuperación disminuye y el %CV aumenta.

Por otra parte, el último estudio en el que se ha sustituido el MeOH por agua indica que si no hay MeOH en el eluyente, el MCPA no se recupera.

6.5.2. ESTUDIO DEL VOLUMEN DE RUPTURA

El volumen de ruptura es el volumen máximo de muestra que se puede procesar mediante SPE sin que haya pérdidas en la recuperación del analito.

Para realizar el estudio del volumen de ruptura, en la etapa de carga del SPE se han procesado diferentes volúmenes de patrón de MCPA en diferentes concentraciones iniciales (Tabla 22). En todos los casos, la elución se ha realizado con 2 mL de MeOH:ACH 90:10, de manera que la concentración final esperada del analito teniendo en cuenta el factor de pre-concentración es siempre de 1 ppm. En la Tabla 22 se muestran las condiciones de los diferentes ensayos, que se han realizado siempre por triplicado.

Tabla 22: Ensayos de SPE realizados para estudiar el volumen de ruptura

Volumen procesado	Volumen eluyente	Factor de concentración	[MCPA] _{inicial} (ppm)	[MCPA] _{final esperada} (ppm)
250 mL	2 mL	125	0,008	1
100 mL	2 mL	50	0,02	1
25 mL	2 mL	12,5	0,08	1
5 mL	2 mL	2,5	0,4	1

El gráfico de la Figura 9 muestra los porcentajes de recuperación de MCPA para los diferentes volúmenes de muestra procesados.

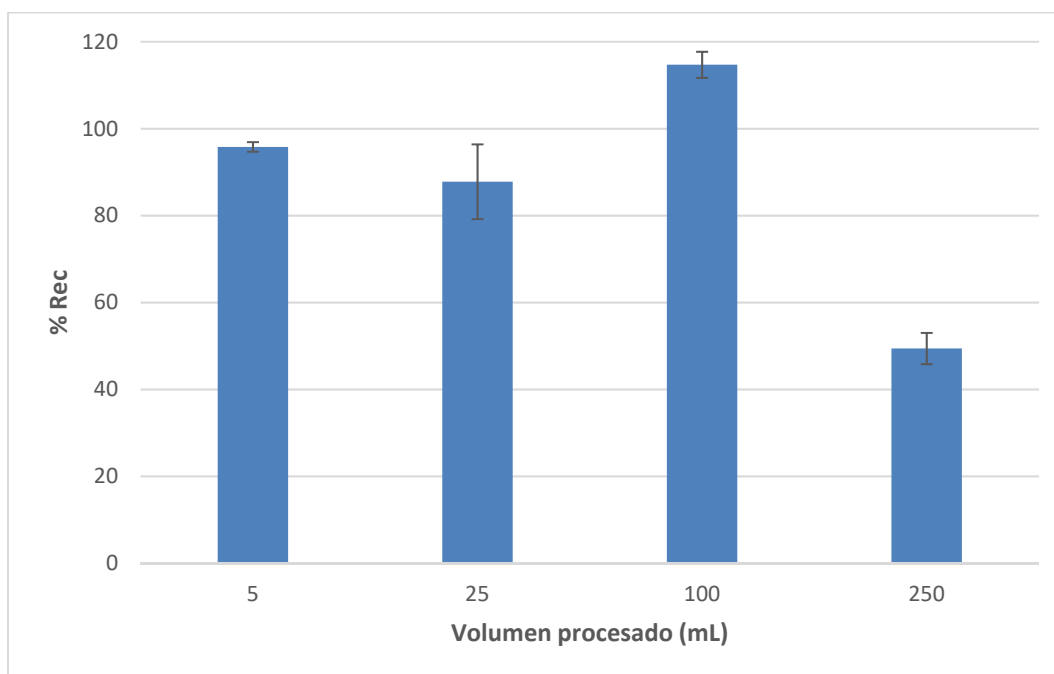


Figura 9: Porcentajes de recuperación de MCPA para diferentes volúmenes de muestra procesados empleando el MIP 4-VP ACN 24 horas

Se observa que en el gráfico de la Figura 9 que la recuperación del MCPA es próxima a 100% para volúmenes de hasta 100 mL. Sin embargo, cuando se procesan 250 mL el porcentaje de recuperación es cercano al 50%, lo que indica que el MCPA se va perdiendo durante la etapa de carga. Por tanto, el volumen de ruptura es de 100 mL, es decir, se pueden procesar hasta 100 mL sin que haya pérdidas de MCPA.

6.6. SPE DE MEZCLAS DE PLAGUICIDAS FENOXIÁCIDOS CON MIP 4-VP ACN 24 HORAS

A continuación, se estudió la capacidad de extracción del sorbente *MIP 4-VP ACN 24 HORAS* empleando mezclas de MCPA con otros 5 plaguicidas fenoxiácidos (4CPA, MCPP, MCPB, Fenoxaprop y Haloxyfop).

Para este estudio, se ha realizado una mezcla de los 6 plaguicidas con 0,5 ppm de cada uno en 5 mL de agua. La mezcla se ha procesado en la etapa de carga del SPE, se ha lavado con 2,5 mL de agua y se ha eluido con 2 mL de MeOH:ACH 90:10, aforados finalmente a 5 mL con agua. Posteriormente se han analizado los plaguicidas mediante HPLC. Los porcentajes de recuperación de los 6 plaguicidas tras el SPE se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23: SPE de mezclas de 6 plaguicidas con MIP 4-VP ACN 24 horas

Compuesto	%Rec ± s
4CPA	70 ± 10
MCPA	95 ± 5
MCPP	89 ± 9
MCPB	90 ± 8
Fenoxaprop	107 ± 7
Haloxyfop	89 ± 9

En general, las recuperaciones son buenas (>89%) para todos los compuestos, excepto para el 4-CPA que al ser el compuesto más polar y más pequeño, se pierde en parte al procesar.

Este sorbente, además de resultar adecuado para la extracción del MCPA, que se ha utilizado como plantilla en la polimerización, es capaz de extraer cuantitativamente plaguicidas de la familia del MCPA con estructuras muy similares como MCPP y MCPB. Otros plaguicidas fenoxiácidos con estructuras algo más grandes, como fenoxaprop y haloxyfop, también consiguen extraerse con buenas recuperaciones.

6.7. APLICACIÓN DE SPE A MUESTRAS DE AGUA REALES CON MIP 4VP ACN 24 HORAS.

Finalmente, se ha procedido al análisis de 3 muestras de agua reales:

- Agua de grifo de ósmosis (Sueca)
- Agua de pozo (Sueca)
- Agua mineral Bezoya

Para el análisis, se ha aplicado el SPE a 100 mL de muestra de agua aditivada con la mezcla de 6 plaguicidas empleada en el apartado anterior (concentración inicial de todos los compuestos en la mezcla 0,025 ppm; concentración final tras SPE 0,5 ppm). Posteriormente,

se han analizado los plaguicidas mediante HPLC. Aunque se espera que las muestras no contengan plaguicidas a los niveles de concentración estudiados, también se ha aplicado el proceso SPE + HPLC a las muestras de agua sin aditivar (blanco de muestra) con la finalidad de comprobar la presencia o ausencia de dichos plaguicidas en las muestras.

6.7.1. SPE DE MUESTRA DE AGUA DE GRIFO DE ÓSMOSIS (SUECA)

Se ha aditivado una muestra de 100 mL de agua de grifo de ósmosis con la mezcla de 6 plaguicidas (0,025 ppm de cada compuesto) para procesarla por el *MIP ACN 24 HORAS* mediante SPE, que se ha lavado con 2,5 mL de agua y se ha eluido con 2 mL de MeOH:ACH 90:10 aforados a 5 mL con agua (concentración final 0,5 ppm cada compuesto). Los porcentajes de recuperación obtenidos en la etapa de elución para cada compuesto se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: SPE de muestra de agua de grifo con MIP 4-VP ACN 24 horas

Compuesto	%Rec \pm s
4CPA	58 \pm 11
MCPA	85 \pm 3
MCPP	102 \pm 3
MCPB	93,0 \pm 0,2
Fenoxaprop	87 \pm 6
Haloxifop	92 \pm 6

Al igual que en el estudio de mezclas, la recuperación es buena (>85%) para todos los compuestos excepto para el 4CPA, que es el compuesto más polar y se pierde en parte al procesar. Por otra parte, el blanco de muestra no presentaba ninguno de los plaguicidas estudiados.

La extracción ha resultado efectiva con esta muestra real, aunque se ha de mencionar que se trata de una muestra de agua de grifo tratada mediante ósmosis inversa, por lo que se espera que tenga pocas interferencias.

6.7.2. SPE DE MUESTRA DE AGUA DE POZO

Se ha recogido una muestra de agua de un pozo en la localidad de Sueca (Valencia). La muestra (100 mL) se ha tratado mediante SPE con el *MIP ACN 24 HORAS* siguiendo el mismo procedimiento que la muestra anterior, y la fracción de elución se ha analizado mediante HPLC (Tabla 25).

Tabla 25: SPE de muestra de agua de pozo con MIP 4-VP ACN 24 HORAS

Compuesto	%Rec ± s
4CPA	50 ± 5
MCPA	18 ± 6
MCPP	19 ± 5
MCPB	78 ± 8
Fenoxaprop	101 ± 6
Haloxyfop	90 ± 10

Esta muestra ha proporcionado resultados de extracción muy malos para 4CPA, MCPA y MCPP. El 4CPA ha dado resultado similar a las mezclas de patrones, por lo que posiblemente se escapa debido a su alta polaridad. El MCPA y el MCPP han dado recuperaciones muy bajas, posiblemente debido a la presencia de interferentes orgánicos como los ácidos húmicos y fúlvicos, habituales en el suelo, que al salir de la columna han solapado los picos de estos compuestos y el sistema HPLC no los haya podido detectar correctamente. De hecho, en el blanco de muestra se observaba una banda ancha en la zona de salida de dichos compuestos.

Por otra parte, los compuestos más apolares (MCPB, Fenoxaprop y Haloxyfop) se recuperan relativamente bien (%Rec entre 78-104%).

6.7.3. SPE DE MUESTRA DE AGUA MINERAL (BEZOYA)

Se ha aditivado una muestra de agua mineral (100 mL) con la mezcla de 6 plaguicidas (concentración inicial 0,025 ppm de cada compuesto). La muestra aditivada se ha procesado mediante SPE con el *MIP ACN 24 HORAS*, lavando con 2,5 mL de agua y eluyendo con 2 mL de MeOH:ACH aforando a 5 mL con agua (concentración final de los compuestos 0.5 ppm c/u). Los porcentajes de recuperación obtenidos en la etapa de elución para cada compuesto se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: SPE de muestra de agua mineral (Bezoya) con MIP 4-VP ACN 24 horas

Compuesto	%Rec ± s
4CPA	56 ± 13
MCPA	73 ± 9
MCPP	88 ± 14
MCPB	88 ± 3
Fenoxaprop	96 ± 6
Haloxyfop	92 ± 2

Se observa que la mayoría de los compuestos tienen recuperaciones adecuadas. El 4CPA sigue dando recuperaciones bajas, posiblemente debido a su carácter polar. Y el MCPA pierde cerca del 27% en esta muestra, posiblemente debido a la presencia de cationes y aniones habituales en el agua embotellada (bicarbonatos, cloruros, calcio, magnesio, etc.) que modifican la fuerza iónica de la disolución y hacen que se pierda una parte del MCPA en la etapa de carga.

7. CONCLUSIONES

Se han preparado polímeros de impronta molecular y los correspondientes polímeros sin impronta en diferentes condiciones de polimerización, para emplearlos como sorbentes en cartuchos para extracción en fase sólida del MCPA y otros 5 compuestos de la familia de los fenoxiácidos.

En primer lugar, con los polímeros en los que se ha utilizado el MAA como monómero, se perdía el MCPA en las etapas de carga y lavado, por lo que se descartaron.

En segundo lugar, con los polímeros en los que se ha utilizado el 4-VP como monómero, con un tiempo de contacto de 20 minutos y tolueno como porógeno, proporcionaron siempre datos muy buenos de recuperación en la etapa de elución, y similares para los polímeros MIP y NIP. No se ha encontrado ninguna condición en la que el polímero NIP perdiese el MCPA y el polímero MIP no lo perdiese. Así que aunque existían fuertes interacciones del polímero con el MCPA, éstas no eran específicas.

Los polímeros seleccionados fueron los sintetizados con 4-VP como monómero, ACN como porógeno y 24 horas de contacto. Tras el SPE lavando con agua, no había pérdidas de MCPA, que se recuperaba cuantitativamente en la elución al emplear el MIP. Sin embargo, el NIP presentaba una pérdida de MCPA cercana al 20% en las etapas de carga y Lavado. En este caso, se consideró que las interacciones del MCPA con el polímero sí eran específicas, debidas a los huecos, lo que aporta selectividad.

Con el *MIP 4VP ACN 24 HORAS* se estudió la capacidad de preconcentración tras el SPE, y se dedujo que se pueden procesar sin pérdidas hasta 100 mL de patrón de MCPA y realizar la elución cuantitativa con 2 mL de eluyente, lo que permite un factor de pre-concentración de 50.

Al aplicar el proceso de extracción a una mezcla patrón de 6 compuestos fenoxiácidos con estructuras similares se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para todos los compuestos, obteniendo solo ligeras pérdidas para el compuesto más polar (4CPA).

Finalmente, se aplicó el proceso de extracción a tres muestras de agua reales de diferente procedencia aditivadas con la mezcla de 6 compuestos. Las muestras más sencillas (agua del grifo de ósmosis y agua mineral bezoya) proporcionaron buenas recuperaciones para todos los compuestos excepto el 4CPA. Por otra parte, con el agua de pozo había interferencias en la determinación de 4CPA, MCPA y MCPP, probablemente debidas a la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos y a la presencia de sales.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Boletín Oficial del Estado*. (21 de Febrero de 2003). Recuperado el 11 de junio de 2019, de <https://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>
- Barberá, C. (1989). *Pesticidas agrícolas* (4ª ed.). Barcelona: Omega, D.L.
- Cromlab. (s.f.). *Cromlab*. Recuperado el 3 de Junio de 2019, de http://www.cromlab.es/Index_principal.htm
- D.A. Skoog, J.J. Leary. (1994). *Análisis Instrumental* (4ª ed.). Madrid: McGraw-Hill.
- E. Herrero-Hernandez, R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo. (2009). 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. *Analytica Chimica Acta* 650, 195-201.
- E.Herrero; E. Rodríguez-Gonzalo; M.S. Rodríguez-Cruz; R. Carabias-Martínez; M.J. Sánchez-Martín. (2015). Efficiency of a molecularly imprinted polymer for selective removal of phenols and phenoxyacids from contained waters. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 12:3079-3088.
- FAO. (noviembre de 2002). *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>
- S. Meseguer-Lloret, S. Torres-Cartas, M. Catalá-Icardo, C. Gómez-Benito. (2016). Selective and sensitive chemiluminescence determination of MCPB: flow injection and liquid chromatography. *Applied spectroscopy*, 70 (2), 312-321.
- S. Torres-Cartas; C. Gómez-Benito; S. Meseguer-Lloret. (2012). FI on-line chemiluminescence reaction for determination of MCPA in water samples. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 402, 1289-1296.
- Soledad-Rodríguez, B. E. (7 de Septiembre de 2017). Empleo de Polímeros de Impronta Molecular como pre-concentradores de muestras en el análisis químico de trazas. *Rev. Tekhné*, 20(2), 003-022.
- Web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. (s.f.). Recuperado el 11 de Junio de 2019, de <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/proexi.asp?IdFormulado=50066>