

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITÈCNICA SUPERIOR DE GANDIA

GRAU EN CIÈNCIES AMBIENTALS

---



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA  
SUPERIOR DE GANDIA

**“DESENVOLUPAMENT D’UN  
SORBENT MAGNÈTIC PER A  
L’EXTRACCIÓ SELECTIVA  
D’HERBICIDES FENOXIÀCIDS EN  
MOSTRES D’AIGUA”**

***TREBALL FINAL DE GRAU***

Autora:

**Irene Botella**

Tutores:

**Sagrario Torres Cartas**

**Susana Meseguer Lloret**

***GANDIA, 2021***



## ABSTRACT

Phenoxyacid herbicides are used in agriculture to prevent the growth of bad broadleaf weeds on crops such as wheat and rice. Among the most common phenoxyacid herbicides are MCPA, MCPB, MCPP, Fenoxaprop and Haloxyfop. Given their common use and high toxicity, it is a priority to control the presence of residues of these herbicides in surface and groundwater, being generally analyzed by chromatographic techniques combined with extraction techniques.

The maximum permitted concentration of these compounds, according to drinking water legislation, is 0.1 µg/L. Due to the usual low concentrations and the complexity of samples, it is necessary to extract the herbicide from the sample matrix. Taking into account that water samples can contain chemical compounds of different nature, it is necessary to use a selective sorbent, such as molecularly imprinted polymers (MIPs), for the specific extraction of phenoxyacid herbicides. MIPs are polymers synthesized in the presence of a template compound, which is removed after the synthesis process. Thus, a footprint is left on the polymer structure. This footprint allows the selective recognition of the template (or chemically similar compounds) when the MIP is used as a solid-phase sorbent in the extraction process.

The use of magnetic solid-phase extraction allows the simplification of the extraction process: the extracting sorbent is poured directly into the water sample, and after a period of contact between the solid and the sample, the separation of the sorbent, which has adsorbed the analyte of interest, is carried out by a magnet. This type of extraction is called magnetic solid phase extraction (MSPE)

In this work, a MMIP sorbent, with MCPA as template, and a MNIP have been prepared in the laboratory. Extraction capacity of both polymers for MCPA have been studied and the molecular imprinting factor of MIP has been established at different washing step conditions, until the optimum condition for the selective extraction of MCPA has been found. Under this condition, the selective extraction capacity of MMIP for the other phenoxyacid herbicides have been established. The different key parameters in the extraction procedure have been also optimized (adsorption time, pH...). The analysis of herbicides after the extraction step is carried out by high-performance liquid chromatography and the separation of the selected pesticides has been also established.

Finally, the MSPE process with MMIP combined with the chromatographic analysis at optimal conditions have been applied to the analysis of phenoxyacids in water samples of different sources.

Keywords: Molecular Imprinted Polymer (MIP); MCPA; Phenoxyacids; Magnetics Solid Phase Extraction (MSPE); Preconcentration; Chromatograph

## INDEX D'ABREVIATURES

4-VP: 4-vinilpiridina

AIBN: azo-bis-isobutironitril

C18: cadena orgànica de 18 carbonis

DAD: detector de fila de diodes

EGDMA: dimetilacrilat d'etilenglicol

FA: fenoxiàcids

Fenoxaprop o FEN: (RS)-2-[4-(6-clorobenzoxazol-2-iloxi)fenoxi]propionat d'etil

GC: cromatografia de gassos

Haloxifop o HAL: Metil(RS)-2-{4-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridiloxi]fenoxi}propionat

HPLC: Cromatografia líquida d'alta resolució

IF: Factor d'empremtació

MCPA: Àcid 2-metil-4-clorofenoxiacètic

MCPB: Àcid 4- (4-cloro-2-metilfenoxi) butanoic

MCPP: Àcid 2-(2-metil-4-clorofenoxi)-propionàic

MeCN: acetonitril

MeOH: metanol

MeOH:AcH

MIP: polímer d'empremta molecular

MMIP: polímer magnètic d'empremta molecular

MMISPE: extracció en fase sòlida magnètica amb un polímer de empremta molecular

MNIP: polímer magnètic sense empremta molecular

MNPs: nanopartícules magnètiques

MSPE: extracció en fase sòlida magnètica

NIP: polímer sense empremta molecular

SPE: extracció en fase sòlida

VMNP: nanopartícules magnètiques vinilitzades

VTMS: viniltrimetoxisilà

# INDEX

1.	INTRODUCCIÓ .....	1
1.1	HERBICIDES FENOXIÀCIDS .....	2
1.2	LEGISLACIÓ .....	4
1.3	CROMATOGRÀFIA .....	4
1.4	POLÍMERS D'EMPREMTA MOLECULAR .....	9
1.4.1	Composició dels MIPs .....	10
1.4.2	Síntesi d'un MIP .....	12
1.4.3	Tipus d'interaccions plantilla-polímer .....	14
1.5	MÈTODES D'EXTRACCIÓ .....	15
1.5.1	Extracció en fase sòlida amb un polímer d'empremta molecular (MMISPE) .....	17
1.5.2	Etaques del procés d'extracció MMISPE .....	18
2.	CONTEXT .....	21
3.	OBJECTIUS .....	21
4.	MATERIAL, REACTIUS I INSTRUMENTACIÓ .....	22
5.	PROCEDIMENT EXPERIMENTAL .....	23
5.1	SÍNTESI DE LES VMNPs .....	23
5.1.1	Síntesi de les MNPs .....	23
5.1.2	Vinilització de les MNPs .....	25
5.2	SÍNTESI DE MMIP i MNIP .....	26
5.2.1	Síntesi i neteja del MMIP .....	26
5.2.3	Polimerització del MNIP .....	28
5.4	PROCÉS D'EXTRACCIÓ MMISPE .....	30
5.5	ANÀLISI CROMATOGRÀFIC .....	30
5.5.1	Anàlisi cromatogràfic individual de MCPA .....	31
5.5.2	Anàlisi cromatogràfic d'una mescla de 5 herbicides fenoxiàcids .....	31
5.6	RECOLLIDA, CONSERVACIÓ I ANÀLISI DE MOSTRES D'AIGUA .....	32
6.	RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	33
6.1	ESTUDI PRELIMINAR .....	33
6.1.1	Selectivitat del MMIP front al MNIP .....	33

6.2. OPTIMITZACIÓ DEL MMISPE .....	35
6.2.1. Estudi del temps d'adsorció .....	36
6.2.2. Temperatura de l'etapa d'adsorció .....	37
6.2.3. Estudi del pH de l'etapa d'adsorció.....	38
6.2.4. Estudi de la quantitat de sorbent MMIP .....	39
6.2.5. Estudi del volum de ruptura .....	40
6.2.6. Volum de dissolució per a l'etapa d'elució .....	41
6.2.6. Reutilització del sorbent .....	42
6.3. MÈTODE MMISPE-HPLC.....	43
6.3.1. Linealitat i sensibilitat del mètode MMISPE-HPLC .....	44
6.3.3. Validació de l'exactitud del mètode MMISPE-HPLC .....	45
6.3.4 Anàlisi de la presència d'herbicides fenoxiàcids a les mostres d'aigua .....	46
7. CONCLUSIONS .....	47
8. BIBLIOGRAFIA .....	49

# 1. INTRODUCCIÓ

Els herbicides fenoxiàcids són dels més utilitzats des del seu debut comercial a mitjans del segle XX, motiu pel qual han sigut detectats en aigües de consum. La detecció d'aquests compostos és important a causa del seu caràcter tòxic. No obstant això, es troben en molt baixes concentracions a les mostres d'aigua d'origen ambiental com les aigües de rius, llacs, mar, sèquies, etc. Per això, es necessita una etapa d'extracció que permeti extraure i preconcentrar els herbicides de la mostra abans del seu anàlisi.

Una de les tècniques més utilitzades per a l'extracció de plaguicides d'una mostra aquosa és l'extracció en fase sòlida (SPE). El més usual en aquesta tècnica és treballar amb xeringues o cartutxos farcits d'un sòlid, el qual s'anomena sorbent, en el qual es queden retinguts els compostos d'interès en fer passar la mostra d'aigua a través del sorbent.

Cal tenir en compte que aquest tipus de sorbents són generalment poc selectius, motiu pel qual en aquests últims anys estan desenvolupant-se sorbents més selectius, com són els polímers d'empremta molecular (MIP). Aquests polímers es sintetitzen al laboratori en presència del compost a analitzar, que s'elimina en la fase de llavat del polímer, deixant unes cavitats específiques, que faciliten que l'analit quedi retingut temporalment al polímer en l'etapa d'extracció. La presència d'aquestes cavitats específiques a l'estructura del polímer permet l'extracció selectiva del compost o de compostos de la seua família que presenten característiques estructurals semblants.

D'altra banda, si el sorbent es prepara en presència de nanopartícules magnètiques, el procés d'extracció s'anomena extracció en fase sòlida magnètica (MSPE). En el cas que es combinen els sorbents MIP amb nanopartícules magnètiques, s'obté un polímer magnètic d'empremta molecular (MMIP) i el procés d'extracció s'anomena MMISPE (extracció en fase sòlida magnètica amb polímers d'empremta molecular). En la MMISPE, donades les característiques magnètiques del sorbent, aquest es pot posar directament en contacte amb la mostra d'aigua, que conté els herbicides, per a la seua extracció i, fent ús d'un imant, es separen de manera senzilla el sòlid que conté els herbicides adsorbits a la seua superfície de la resta de la mostra; posteriorment, caldrà desorbir els analits per a dur a terme l'anàlisi.

En aquest TFG s'han sintetitzat al laboratori nous sorbents polimèrics magnètics, amb empremta i sense empremta (MMIP i MNIP, respectivament), que permeten l'extracció selectiva i quantitativa d'herbicides fenoxiàcids presents en mostres d'aigua mitjançant MMISPE, per a la seua posterior determinació mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució.

## 1.1 HERBICIDES FENOXIÀCIDS

Un herbicida és un tipus de plaguicida que s'utilitza per inhibir o interrompre el desenvolupament selectiu de plantes, en cultius o terrenys que van a ser cultivats. Les principals famílies d'herbicides són: hormonals, de contacte, amb activitat al sòl, i amb activitat foliar i translocació.

Els herbicides inclosos en aquest treball són els anomenats fenoxiàcids, que són derivats de l'àcid fenoxiacètic, fenoxi-isopropiònic i fenoxi-butíric. Es tracta d'una família d'herbicides amb activitat foliar i translocació, ja que actuen a través de la part aèria de la planta i són transportats pels feixos vasculars. A més, estan classificats com herbicides hormonals o reguladors del creixement a causa de la semblança del comportament amb les fitohormones del tipus auxines.

Els herbicides fenoxiàcids s'han emprat extensament degut al seu baix cost, l'elevada solubilitat en aigua, la curta persistència i l'elevada selectivitat ja que exerceixen la seua acció sobre les dicotiledònies i són innocus per a les gramínies [1].

D'altra banda, cal tenir en compte els efectes adversos d'aquests herbicides sobre el medi ambient, especialment als medis aquàtics, donada la seua llarga persistència. En primer lloc, els herbicides fenoxiàcids són altament mòbils i, depenent del tipus de sòl, poden infiltrar-se fins a arribar a aigües subterrànies. En segon lloc, quan es troben presents en concentracions suficientment elevades, disminueixen la capacitat nitrificant del sòl i produeixen efectes nocius a la seua microflora. Finalment, cal mencionar la toxicitat moderada, tant dels fenoxiàcids com dels seus productes de degradació, en animals superiors. Aquesta toxicitat està lligada a la presència d'àtoms de clor en la seua estructura, podent arribar a produir efectes teratogènics i mutagènics [2].

Els herbicides que s'han analitzat en aquest estudi són l'àcid 2-metil-4-clorofenoxiacètic (MCPA), l'àcid 2-(2-metil-4-clorofenoxi)-propionàic (MCPB), l'àcid 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)butanoic (MCPB), el (RS)-2-[4-(6-clorobenzoxazol-2-iloxi)fenoxi]propionat d'etil (Fenoxaprop, FEN), i el Metil(RS)-2-[4-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridiloxi]fenoxi]propionat (Haloxifop, HAL). A la figura 1 es mostren les estructures químiques dels cinc herbicides.



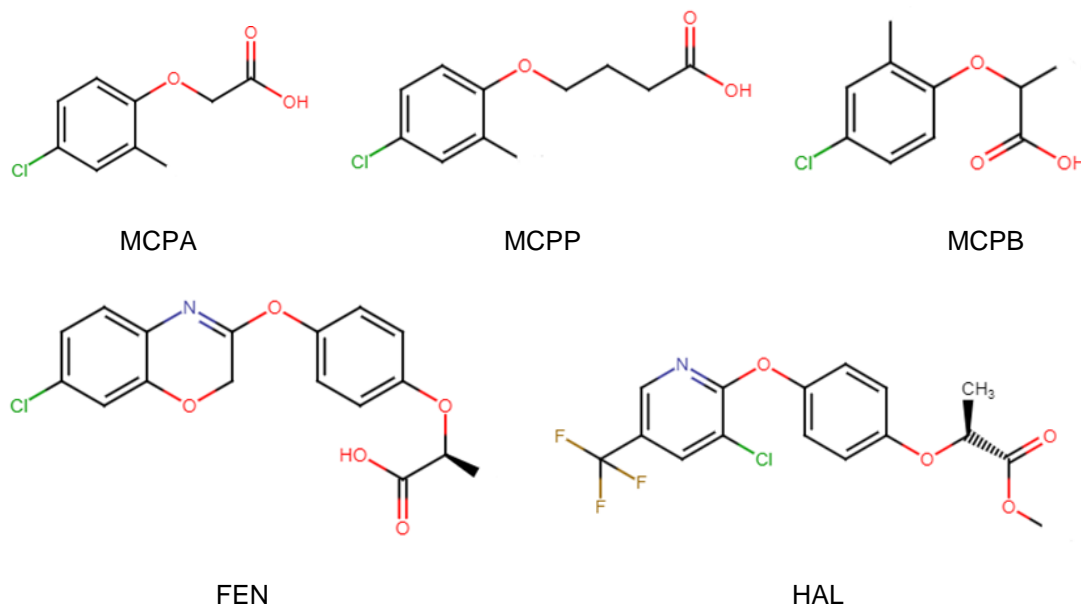


Figura 1. Estructura química dels herbicides fenoxiàcids inclosos en aquest estudi (font: Pròpia)

El MCPA és un èster tioetílic que s'empra especialment per al control de dicotiledònies en cultius de gramínies i en cultius llenyosos. Entre les característiques més rellevants es troba la seua mobilitat i capacitat per lixiviar-se. La seua activitat residual té una durada d'entre 3 i 4 mesos [1].

D'altra banda, el MCPB, que s'utilitza com a herbicida abans i després de l'emergència per a controlar les males herbes de fulla ampla en cultius de gramínies i cereals, té un temps de vida mitjà de al voltant de 5 dies, excepte quan els microorganismes estan aclimatats a la seua acció, en aquest cas la duració és de menys d'un dia [3].

El temps de vida mitjà de MCPP també és curt, d'entre 7 i 13 dies, i s'utilitza per al control post-emergent selectiu de mala herba de fulla ampla en cultius de poàcies, pastures i cultius perennes; cal remarcar que té un efecte tòxic sobre els bacteris d'aigua dolça encarregats de la purificació de l'aigua [4].

El medi d'acció de FEN és la inhibició de la biosíntesi de lípids. Entre les seues característiques destaca la selectivitat en cultius de fulla ampla, blat i arròs. En el sòl és poc persistent, al cap de 6 dies les concentracions són indetectables a més de ser immòbil, i a l'aigua presenta solubilitats diferents i té una vida mitjana de 4 hores [1].

Finalment, el HAL també presenta selectivitat pels cultiu de fulla ampla. Al sòl no és persistent, la seua vida mitjana varia depenent del pH del sòl, variant des d'unes quantes hores fins a 33 dies i presenta una alta mobilitat. A l'aigua és mitjanament soluble i té un potencial de lixiviació moderat. A més, el haloxifop-p-metil, un derivat d'aquest compost, és altament tòxic per als peixos [5].

## 1.2 LEGISLACIÓ

El Real Decret 140/2003 pel que s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà, annex I, apartat B.1 estableix per a plaguicides una concentració màxima admissible de 0.1 µg/L per a un plaguicida individual, i de 0.5 µg/L per a plaguicides totals.

D'altra banda, el Real Decret 849/1986 pel qual s'aprova el Reglament del Domini Públic Hidràulic disposa que el màxim nivell de concentració per al abocaments de pesticides és 0.5 µg/L.

## 1.3 CROMATOGRAFIA

El mètode d'anàlisi utilitzat en aquest treball per a l'anàlisi dels herbicides fenoxiàcids és un mètode cromatogràfic. La cromatografia engloba un conjunt de tècniques que permeten aconseguir la separació i quantificació dels components d'una mescla. Es caracteritza per la presència de dues fases: una fase estacionària, que roman immòbil a l'interior del sistema, i una fase mòbil, que es desplaça al llarg del sistema. Les diferents capacitats d'interacció de cada component d'una mescla amb la fase mòbil i estacionària permetran la seua separació [6].

La classificació dels diferents tipus de cromatografia es realitza atenent al fonament de la separació, és a dir, depenent de la naturalesa de les fases mòbil i estacionària i les interaccions predominants.

La classificació més senzilla atén a la naturalesa de les fases mòbil i estacionària:

- En la *cromatografia líquida* (LC), la fase mòbil és un líquid i la fase estacionària és un sòlid o un líquid adsorbit sobre un sòlid inert empaquetat dins d'una columna. Quan el sistema treballa a altes pressions, s'anomena cromatografia líquida d'alta pressió o d'alta resolució (HPLC).
- En la *cromatografia de gasos* (GC), la fase mòbil és un gas i la fase estacionària és un sòlid o un líquid adsorbit sobre un sòlid inert empaquetat dins d'una columna.

A continuació, es comenta la classificació dels mètodes cromatogràfics atenent al tipus d'interaccions entre els anàlits i les fases mòbil i estacionària dels sistemes cromatogràfics.

En primer lloc, els mètodes de *cromatografia de líquids amb fase mòbil líquida i fase estacionària sòlida*, es classifiquen en:

- Cromatografia líquida *d'adsorció*, que utilitza la polaritat per obtenir la separació dels soluts. La fase estacionària és més polar que la fase mòbil.
- Cromatografia líquida *d'intercanvi iònic*, en la qual el sòlid reté els soluts atenent a atraccions/repulsions electrostàtiques.
- Cromatografia líquida *d'exclusió*, en que la fase estacionària és un material porós que permet la retenció o exclusió de molècules depenent de la forma i grandària.

En segon lloc, els mètodes de *cromatografia de líquids amb fase mòbil líquida i fase estacionària líquida* es classifiquen en:

- Cromatografia líquida *de partició*, en la qual el líquid de la fase estacionària es troba immobilitzat sobre un sòlid inert, i la separació dels compostos es deu a les diferències de solubilitat d'aquests entre ambdues fases.
- Cromatografia líquida *d'afinitat*, que utilitza l'especificitat d'algunes molècules biològiques per aconseguir la separació dels compostos. En aquest cas, també la diferència de solubilitats és un mecanisme de separació indispensable.

Finalment, la *cromatografia de gasos*, es classifica en:

- Cromatografia gasosa *d'adsorció*, en la qual els soluts són retinguts en la fase estacionària sòlida mitjançant processos d'adsorció.
- Cromatografia gasosa *de partició*, que es fonamenta en els equilibris de distribució, ja que la fase estacionària és un líquid que es troba adsorbit sobre un sòlid inert.

A més de les classificacions anteriors, que atenen a la naturalesa de les fases mòbil i estacionària i al tipus d'interaccions, la cromatografia es classifica atenent a la composició i/o temperatura de la fase mòbil, de la següent manera:

- En la  *cromatografia líquida*, la fase mòbil pot variar o no la seua composició al llarg de l'anàlisi, de forma que es distingeix entre la cromatografia líquida amb  *elució isocràtica*, en la qual la fase mòbil té una composició fixa d'eluent, i la cromatografia líquida amb  *elució en gradient*, en la qual la composició de la fase mòbil varia al llarg de l'anàlisi.
- En la  *cromatografia de gasos*, es parla d' *elució isocràtica* quan la composició de la fase mòbil i la temperatura no varien al llarg de l'anàlisi, i d' *elució en gradient* quan la composició de la fase mòbil o la temperatura varien al llarg de l'anàlisi [7].

El mètode cromatogràfic emprat en aquest estudi per a l'anàlisi dels herbicides fenoxiàcids és l'HPLC de partició amb elució en gradient. En el nostre cas, la fase estacionària és apolar i es troba a l'interior d'una columna d'acer, i la fase mòbil és polar i s'encarrega d'impulsar la mostra des del sistema d'injecció a través de la columna fins arribar al detector. Degut a la variació de la composició de la fase mòbil al llarg de l'anàlisi, els compostos que es detecten en primer lloc són els més polars. L'esquema de l'instrument d'HPLC emprat per a aquest treball es mostra a la figura 2.

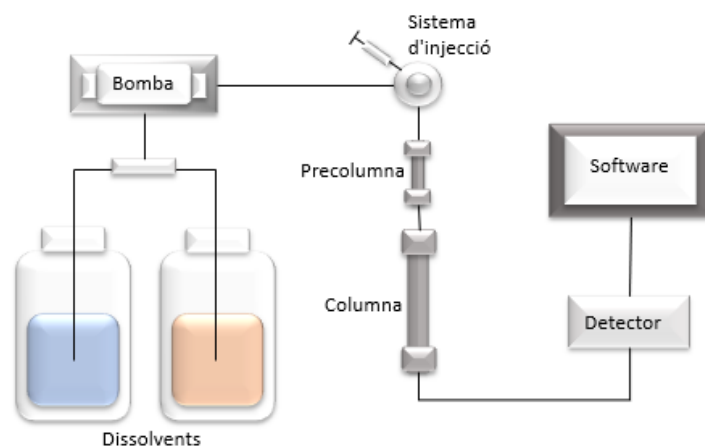


Figura 2: Components bàsics del sistema de HPLC emprat en aquest treball (Font: Pròpia).

L' instrument d' HPLC emprat té els següents components:

- Uns *recipients que contenen la fase mòbil* del sistema. Aquestes botelles contenen dissolvents amb polaritats diferent. El sistema compta amb un sistema per a eliminar gasos dissolts i evitar interferències degudes a la formació de bombolles, encara que les dissolucions de la fase mòbil es posen al ultrasons durant 15 min abans de començar a treballar amb el sistema per a l'eliminació del gasos dissolts.
- El sistema de bombeig, o *bomba*, ha d'estar compost per materials inerts i resistent a la corrosió i tenir les següents característiques: poder generar pressions altes fins a 400 bar, flux lliure de pulsacions, cabals d'entre 0.1 i 10 mL/min, reproductibilitat del cabal millor del 0.5%. Les bombes d'HPLC poden ser de tres tipus: bombes recíproques, bombes de desplaçament i bombes pneumàtiques. En aquest cas s'empra una bomba recíproca, ideal ja que funciona amb un xicotet volum intern, altes pressions d'eixida, cabdals constants i fàcil adaptació al sistema d'elució en gradient. El bombeig del flux és amb pulsacions, el que pot generar soroll al cromatograma. En aquest treball, la velocitat de flux de la fase mòbil era de 1mL/min.
- El *sistema d'injecció* de mostra utilitzat és el de bucles. Aquest sistema ofereix avantatges com no despressuritzar la mostra i la injecció de volums xicotets, la qual cosa aconsegueix augmentar la reproductibilitat. En aquest estudi el volum d'injecció era de 20 µL.
- La *columna cromatogràfica*, en el interior de la qual es troba la fase estacionària, es tracta generalment d'un cilindre d'acer inoxidable farcit amb un sorbent particulat. En el nostre cas, la fase estacionaria està formada per partícules de 5 micres de diàmetre i una estructura de cadenes orgàniques amb 18 carbonis (C18).

Previ a la columna es troba la precolumna, la qual té diverses funcions com: conservar l'estat de la columna, eliminar matèria no desitjada, i saturar la fase mòbil per minimitzar les pèrdues a la columna. La seua composició és la mateixa que la columna, però amb partícules de major tamany per tal de reduir la caiguda de pressió.

- El *detector* ideal deuria reunir les següents característiques: adequada sensibilitat, bona estabilitat i reproductibilitat, una resposta lineal per als anàlits en diferents ordres de magnitud, treballar bé a altes temperatures, un temps de resposta curt, alta fiabilitat, senzill d'utilitzar i no destructiu amb la mostra. Entre els més utilitzats estan els detectors de masses, els d'absorbància en la zona del UV-vis, de fluorescència, o d'índex de refracció. El detector utilitzat en aquest treball és un detector de fila de diodes (DAD) que permet mesurar l'absorbància a distintes longituds d'ona, i l'absorbància seleccionada ha sigut 230 nm.
- Un *sistema per a enregistrar la senyal* del detector, actualment un ordinador amb un software que permet, entre altres coses, programar i controlar el programa d'anàlisi (cabdal i la composició de la fase mòbil, temps d'anàlisi, gradient, volum d'injecció, etc) i emmagatzemar i mostrar la senyal del detector al llarg del temps. Aquest registre de senyal al llarg del temps s'anomena cromatograma [6].

El cromatograma és una representació de la resposta del detector front al temps, magnitud utilitzada per a mesurar l'efluent. Al cromatograma podem observar la línia base, el senyal del detector en absència d'anàlits, i un o diversos pics cromatogràfics, que resulten de la senyal que es genera en l'elució dels distintes components de la mostra. El cromatograma presenta tants pics cromatogràfics com compostos hi haja a la mescla analitzada. A la figura 3 es mostra un cromatograma obtingut amb una mostra amb 2 components; en la mateixa figura es mostren el paràmetres que són fonamentals per a la interpretació d'un cromatograma:

- *Línia base*, senyal detectada en absència dels components de l'elució.
- *Temps mort*, temps on són detectats els components no retinguts per la fase estacionària.
- Temps de retenció, temps transcorregut entre la injecció de la mostra i l'aparició de la resposta deguda a algun dels components o anàlits retinguts per la fase estacionària. El temps de retenció és característic d'un compost en les condicions cromatogràfiques de treball.
- Àrea de pic, el pic pot ser quantificat per la seua àrea, la seua altura, l'amplària del pic a mitjan altura i/o l'amplària del pic a la línia base. En el nostre cas, el paràmetre de quantificació utilitzat és l'àrea de pic, àrea compresa entre el pic de l'anàlit i la línia base [8].

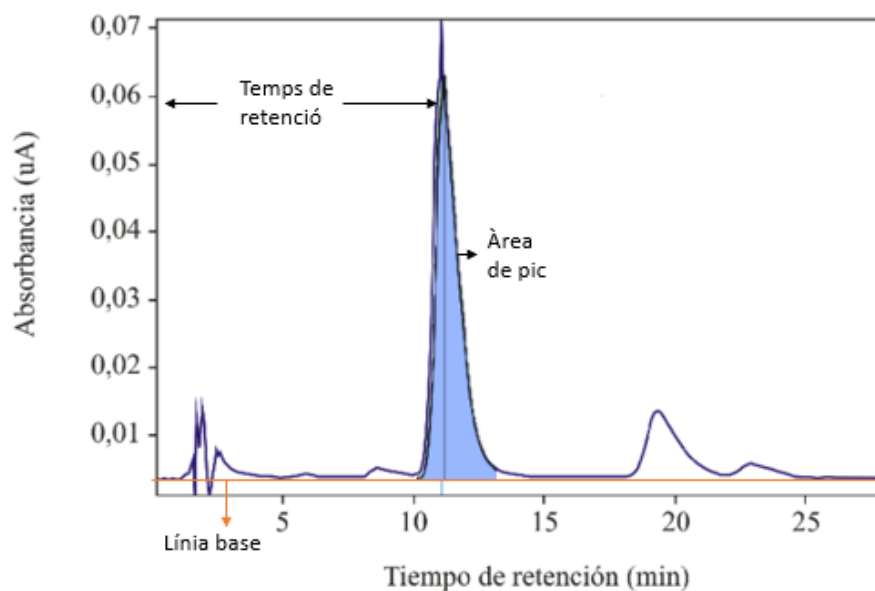


Figura 3. Cromatograma de l'extracte metanòlic de botons frescs. (Font:[9]).

#### 1.4 POLÍMERS D'EMPREMTA MOLECULAR

Els MIPs són materials sintètics d'alta estabilitat, en els que el funcionament és similar als mecanismes de reconeixement molecular selectiu dels sistemes biològics, és a dir, es comporten com els receptors biomimètics (tals com: enzims, anticossos, hormones... ) capaços d'interaccionar de forma selectiva amb un determinat compost mitjançant la discriminació i l'enllaçament.

Un MIP s'obté sintetitzant una estructura polimèrica macromolecular al voltant de la molècula plantilla (el compost a analitzar o anàlit), la qual s'elimina de l'estructura una vegada es completa la polimerització. D'eixa forma, queden en l'estructura del polímer cavitats estructuralment complementàries als grups funcionals de la molècula plantilla, que ofereixen al polímer la capacitat de reconeixement molecular selectiu [10].

D'altra banda, els polímers sense empremta molecular (NIP) també són materials polimèrics sintètics d'alta estabilitat i entrecreuant, que es sintetitzen amb els mateixos components que el MIP però al sintetitzar-los no s'introdueix la molècula plantilla, per la qual cosa no presentaran els llocs de reconeixement selectius per a un determinat anàlit. El NIP presenta unes propietats i mecanismes d'enllaç diferents al MIP.

### 1.4.1 Composició dels MIPs

Els components per a sintetitzar un MIP poden variar amb l'objectiu de modificar el format físic o incrementar la afinitat del MIP per la molècula plantilla, no obstant això, els principals components són:

- *Molècula plantilla o template*

La molècula plantilla és l'anàlit objectiu, el qual es pretén extraure de manera selectiva emprant el MIP. Aquest component ha de ser estable en les condicions físiques emprades durant la reacció de polimerització (temperatura, temps, radiació UV...), i ha de ser soluble en la mescla de polimerització o romandre immobilitzat sobre un substrat en el procés de polimerització. En aquest estudi, la molècula plantilla utilitzada per a la síntesi del MIP és l'herbicida MCPA (figura 1).

- *Monòmer funcional*

Les unitats monomèriques són molècules que han de presentar un grup funcional orgànic (com per exemple, un doble enllaç) el suficientment reactiu per a donar lloc a una estructura polimèrica macromolecular, i a més, han de presentar algun grup funcional en la seua estructura que pugui interaccionar amb la molècula plantilla. En aquest treball, s'ha utilitzat el monòmer funcional 4-vinilpiridina (4-VP) per a la síntesi del MIP. L'estructura química del 4-VP es mostra a la figura 4.

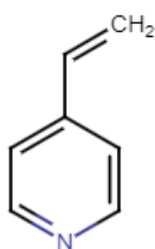


Figura 4. Monòmer funcional (4-VP) utilitzat per a la síntesi del MIP en aquest treball. (Font:Pròpia).



- *Reactiu entrecreuant*

S'encarrega de crear unions entre les cadenes polimèriques, convertint els polímers termoplàstics en termoestables. Aconsegueix la creació d'unions entre les cadenes gràcies a la presència de 2 grups funcionals a la seua estructura que es troben en els dos extrems de la molècula. Per a desenvolupar la seua funció correctament l'entrecreuant s'ha de poder dissoldre en la mescla de polimerització. A la figura 5 es representa l'agent entrecreuant utilitzat per a la síntesi del MIP en aquest estudi, dimetilacrilat d'etilenglicol (EGDMA):

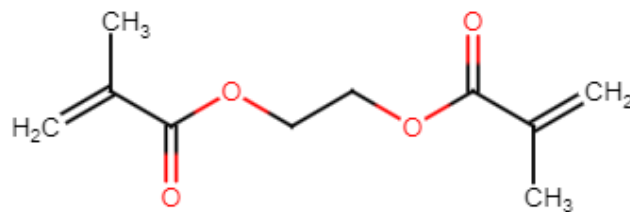


Figura 5. Reactiu entrecreuant (EGDMA) utilitzat per a la síntesi del MIP. (Font:Pròpia).

- *Iniciador*

L'iniciador és una substància que, per l'acció del calor o la radiació UV, és capaç d'escindir-se donant lloc a espècies molt reactives com són els radicals lliures, els carbocations o els carboanions. Aquestes espècies, altament reactives, inicien la reacció de polimerització.

La variació física que ha de donar-se per a la ruptura de l'iniciador (augment de temperatura, irradiació amb llum UV...) no ha d'interferir ni descompondre la resta de components.

El compost encarregat de desenvolupar la funció d'iniciador en aquest estudi experimental ha sigut l'azo-bis-isobutironitril (AIBN), un iniciador radicalari, la estructura del qual es mostra a la figura 6:

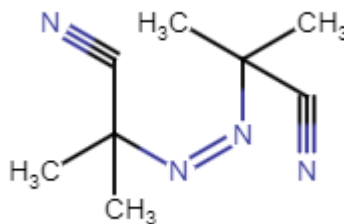


Figura 6. Iniciador (AIBN) utilitzat per a la síntesi del MIP en aquest projecte. (Font: Pròpia).

- *Porogen*

A més del seu paper com a dissolvent, que permet que es troben tots els components de la mescla en una única fase, els agents porogènics tenen la funció d'ajudar en la formació dels porus (macro i microporus) en el polímer final. D'aquesta manera, la presència del porogen confereix una estructura macroporosa que facilita els processos de transferència de massa en l'extracció. El porogen seleccionat pot afectar també a l'estabilitat del complex plantilla-monòmer per la seua polaritat, constant dielèctrica i capacitat de protonació. En el cas dels dissolvents orgànics, si s'utilitza el mateix dissolvent en l'etapa de polimerització que en l'etapa d'adsorció del compost plantilla, es crea una espècie d'efecte memòria, afavorint l'enllaç del compost plantilla al polímer en el procés d'extracció. El dissolvent porogen utilitzat al projecte és l'acetonitril (MeCN), i la seua estructura molecular es mostra a la figura 7.

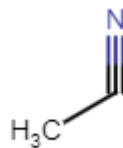


Figura 7. Porogen (MeCN) utilitzat per a la síntesi del MIP en aquest projecte. (Font: Pròpia.)

Generalment, una mescla de prepolimerització presenta tots els components prèviament exposats, però pot haver-n'hi altres components o mancar d'alguns [10].

Per a la síntesi d'un NIP els components que s'utilitzen són els mateixos que per al MIP, excepte que no presenta molècula plantilla (en el nostre cas, sense MCPA).

### 1.4.2 Síntesi d'un MIP

El procés de síntesi d'un MIP consta de tres etapes:

- En primer lloc, s'ha de generar el complex de pre-polimerització. Aquest es forma posant en contacte el compost plantilla, el monòmer funcional i una xicoteta quantitat de porogen; aquests elements han de romandre junts al llarg d'un cert període de temps.
- A continuació, al complex de pre-polimerització se li afegeix l'agent entrecruant, l'iniciador i el porogen. En aquesta fase, per a què la polimerització ocorregués, s'ha d'exposar la barreja d'elements a un focus de calor o llum ultraviolada durant un temps determinat.

- Per finalitzar, s'elimina el compost plantilla de l'estructura del polímer mitjançant un procés de llavat, quedant en el polímer les cavitats específiques complementàries al compost plantilla. Els processos de llavat més habituals són l'extracció Soxhlet, encara que es poden aplicar altres processos com l'extracció sòlid-líquid, tractament tèrmic, digestió per microones o reaccions químiques que eliminen el compost plantilla [11].

A la Figura 8 es mostra el procés de síntesi del MIP de MCPA aplicat en aquest projecte:

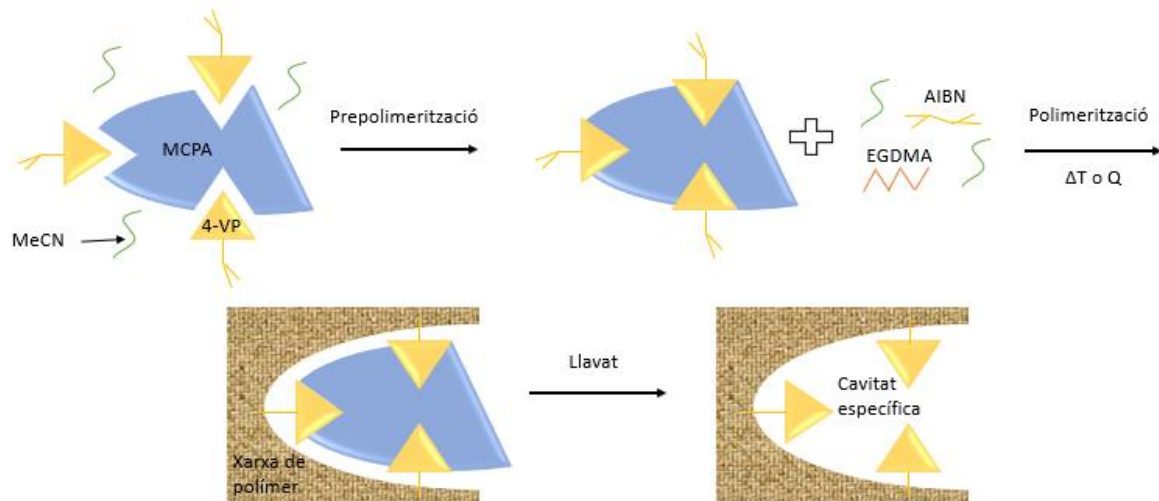


Figura 8. Esquema del procés de síntesi del MIP de MCPA. (Font: Pròpia).

En el nostre cas, en l'etapa de la pre-polimerització es posen en contacte el compost plantilla (MCPA), el monòmer (4-VP) i una part del dissolvent porogen (MeCN) durant un període de temps i en unes condicions específiques, donant lloc al complex de pre-polimerització. Per a l'etapa de polimerització s'afegien l'iniciador (AIBN), l'entrecruent (EGDMA) i la resta de porogen (MeCN), i s'incuba la mescla a sota una font de calor durant un temps, obtenint-se el polímer amb l'MCPA dins de l'estructura. Per últim, en l'etapa de llavat es produeix l'eliminació de la molècula plantilla de la matriu polimèrica, ocasionant les cavitats específiques. Aquestes cavitats ofereixen la característica de reconèixer selectivament l'MCPA i els composts anàlegs a aquest.

Per a la síntesi del NIP no es realitza la etapa de prepolimerització, directament es procedeix a una etapa de polimerització (sense el complex de prepolimerització) i l'etapa de llavat consisteix en un sistema de buit per a eliminar les restes de reactius.

### 1.4.3 Tipus d'interaccions plantilla-polímer

Les interaccions que es generen en l'etapa de pre-polimerització entre el compost plantilla i el monòmer, poden ser de diversos tipus:

- *Interaccions covalents*. Té lloc quan el complex plantilla-monòmer s'ha estabilitzat gràcies a enllaços covalents, que són reversibles.
- *Interaccions no covalents*. Implica que el complex que té lloc entre la plantilla i els monòmers està unit mitjançant interaccions febles com forces de van der Waals de London o dipol-dipol, interaccions iòniques, etc.
- *Interaccions semi-covalents*. En aquest cas, la molècula plantilla s'uneix al monòmer mitjançant enllaços covalents, però el reconeixement selectiu es produeix mitjançant interaccions no covalents [10].

En el polímer sintetitzat en aquest projecte, les interaccions específiques de les cavitats són de dos tipus, ponts d'hidrogen entre l'MCPA i el nitrogen del 4-VP, i les forces d'atracció de London (van der Waals) entre els cicles del 4-VP i del MCPA [12]. A continuació, a la Figura 9, es troben representades aquestes forces.

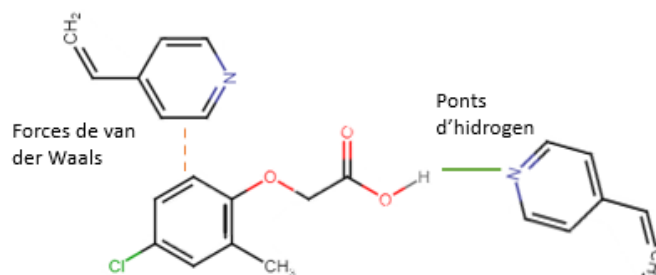


Figura 9. Interaccions de les cavitats específiques al MIP sintetitzat en aquest projecte. (Font: Pròpia).

## 1.5 MÈTODES D'EXTRACCIÓ

El mètode d'extracció és una part fonamental del procés analític. En l'actualitat els mètodes analítics s'han desenvolupat gràcies a la tecnologia i permeten l'anàlisi d'un important nombre de substàncies. Donat l'augment de l'exigència en els límits de detecció de substàncies prioritàries als àmbits sanitari, alimentari i mediambiental, hi ha una tendència al desenvolupament de mètodes d'extracció que milloren les estratègies d'anàlisi. Aquests mètodes, a més d'eliminar les possibles interferències, permeten concentrar els compostos d'interès millorant així la sensibilitat de la determinació.

Així, generalment, abans d'analitzar una mostra mitjançant la cromatografia líquida, la mostra és sotmesa a un procés d'extracció dels compostos d'interès de la matriu, amb l'objectiu d'aïllar el o els anàlits de la matriu on es troben. Per tal d'aconseguir-ho es necessita conèixer les característiques del o dels compostos a analitzar junt amb les de la matriu o mostra. Les tècniques d'extracció es classifiquen atenent a l'estat en el qual es trobe l'extractant: en l'extracció líquid-líquid, a la mostra se li afegeix un dissolvent immiscible per recollir els compostos d'interès i extreure'ls de la matriu on es troben; en els processos d'extracció en fase sòlida, la mostra es posa en contacte amb un sorbent sòlid sobre el qual s'adsorbeixen els compostos d'interès. [13]

Si tenim en compte que els herbicides es troben en les matrius ambientals en concentracions molt baixes, del ordre dels  $\mu\text{g/L}$  o  $\text{ng/L}$ , és essencial la inclusió d'una etapa d'extracció que permeti la preconcentració dels herbicides abans de l'anàlisi mitjançant el sistema cromatogràfic .

Hi ha diferents mètodes aplicables a l'extracció d'herbicides de matrius aquoses.

- *Extracció líquid-líquid.*

Aquest mètode fa ús d'un dissolvent o mescla per a extraure diferents anàlits de la mostra tenint en compte les propietats d'aquests. Alguns dels avantatges que ofereix són, la senzillesa i l'àmplia varietat de compostos que es poden extreure. D'altra banda també presenta alguns desavantatges, ja que la quantitat de dissolvents o mescles necessàries per a l'extracció són elevades i necessiten habitualment etapes posteriors de concentració i purificació dels anàlits.

- *Extracció assistida per microones.*

L'objectiu és transferir els plaguicides de la matriu de la mostra a un dissolvent mitjançant l'aplicació de radiació microones al llarg d'un curt període de temps. Aquest mètode pot causar la degradació d'alguns plaguicides.

- *Extracció en fase sòlida en columna.*

La mostra es fa passar per una columna farcida amb un sorbent sòlid per tal de retindre els pesticides. En aquest cas els pesticides poden ser concentrats si es passa un volum gran de mostra i després, s'elueixen els pesticides amb un volum de dissolvent xicotet.

- *Extracció en fase sòlida dispersiva.*

Es tracta també d'un mètode d'extracció en fase sòlida, però el sorbent s'afig directament a la mostra. L'extracció s'afavoreix mitjançant agitació i, posteriorment, el sorbent es separa de la mostra per decantació, filtració, etc. Un tipus especial d'extracció en fase sòlida dispersiva és MSPE, en la qual el sorbent és magnètic, propietat que permet la separació del sorbent mitjançant un imant.

- *Extracció mitjançant barra d'agitació.*

Es tracta d'un tipus d'extracció en fase sòlida en la qual s'agita la mostra amb una barreta d'agitació recoberta d'una fase sòlida, on es retenen els plaguicides que, posteriorment, s'extreuen amb un dissolvent orgànic.

- *Micro-extracció.*

Aquesta tècnica es caracteritza per utilitzar xicotets volums de mostra, presentar major selectivitat en l'extracció, minimitzar l'ús de dissolvents orgànics i tenir un menor nombre d'etapes. Hi ha micro-extracció en fase sòlida i micro-extracció en fase líquida [7].

D'entre les tècniques d'extracció descrites, en aquest TFG s'ha emprat MSPE amb un sorbent MMIP (MMISPE) per a la l'extracció d'un grup de 5 herbicides fenoxiàcids (MCPA, MCPP, MCPB, FEN i HAL) en medi aquós.

### 1.5.1 Extracció en fase sòlida amb un polímer d'empremta molecular (MMISPE)

Com s'ha comentat, l'MSPE combina l'extracció en fase sòlida i amb les separacions magnètiques. Es basa en la dispersió directa d'un sorbent sòlid amb propietats magnètiques en la mostra a analitzar. La dispersió del sòlid, que es du a terme mitjançant agitació, permet que el o els anàlits de la mostra s'adsorbisquen en el sorbent. Després, es separa el sòlid magnètic de la matriu de la mostra aplicant un camp magnètic extern (imant de Neodimi), i finalment, es desorbixen els anàlits retinguts al sòlid magnètic afegint un xicotet volum d'un dissolvent orgànic apropiat. El sorbent conté nanopartícules amb propietats magnètiques (MNPs) com, per exemple, les nanopartícules de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Aquests nuclis rígids amb propietats magnètiques poden recobrir-se per una capa de polímer que proporcione la selectivitat necessària per a l'extracció dels anàlits, com són els polímers d'empremta molecular, donant lloc a sorbents polimèrics magnètics per a l'extracció en fase sòlida dispersiva [14].

Per poder obtenir al laboratori un sorbent per a MMISPE, s'han de dur a terme les següents etapes (Figura 10):

- La primera etapa consisteix en la síntesi de les MNPs, en el nostre cas, nanopartícules de magnetita. Aquestes nanopartícules es formen al precipitar  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  en una proporció molar 1:2 en una solució alcalina. El procés es pot dur a terme a temperatura ambient o amb calefacció, i en condició atmosfèriques lliures d'oxigen o en una atmosfera inert per un temps determinat.
- A continuació, s'hauran de funcionalitzar les MNPs, recobrint-les amb un compost, la funció del qual es genera punts d'unió entre les MNPs i el polímer, tal com es mostra a la figura 10. Per a això, se li afegeix viniltrietoxisilà (VTMS) a les MNPs. Aquest procés es realitza durant un període de temps determinat i en unes condicions físiques apropiades per a aconseguir el recobriment de la magnetita amb grups vinil [15].

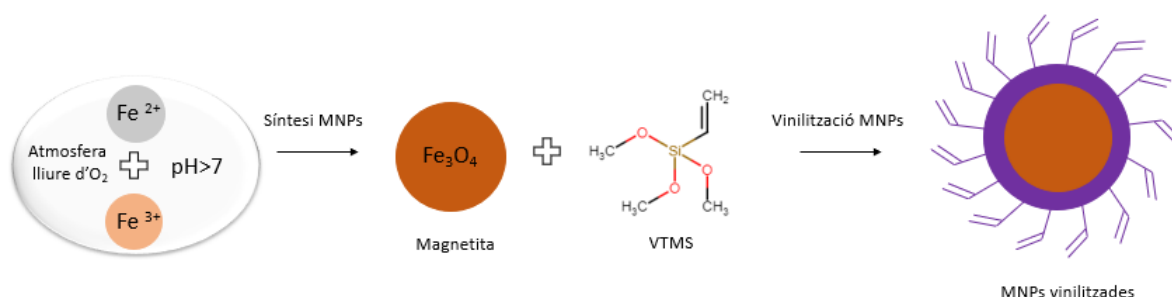


Figura 10. Esquema del procés de síntesi i vinilització de les MNPs. (Font: Pròpia).

- Finalment, les MNPs vinilitzades (VMNPs) es recobreixen amb el polímer (MIP o NIP), el qual té dos funcions, la primera és protegir les MNPs de l'oxidació, i la segona i principal, és obtenir un sorbent amb característiques adequades per a la extracció selectiva dels anàlits en el procés d'extracció. A la figura 11 es mostra aquesta tercera etapa en la qual es forma el MMIP. La metodologia d'obtenció d'un MMIP és similar a la que s'ha explicat en el apartat previ, 1.4.2 "Síntesi d'un MIP", amb l'única diferència de que s'ha d'afegir una quantitat determinada de VMNPs amb la resta de compostos abans de la polimerització [15].

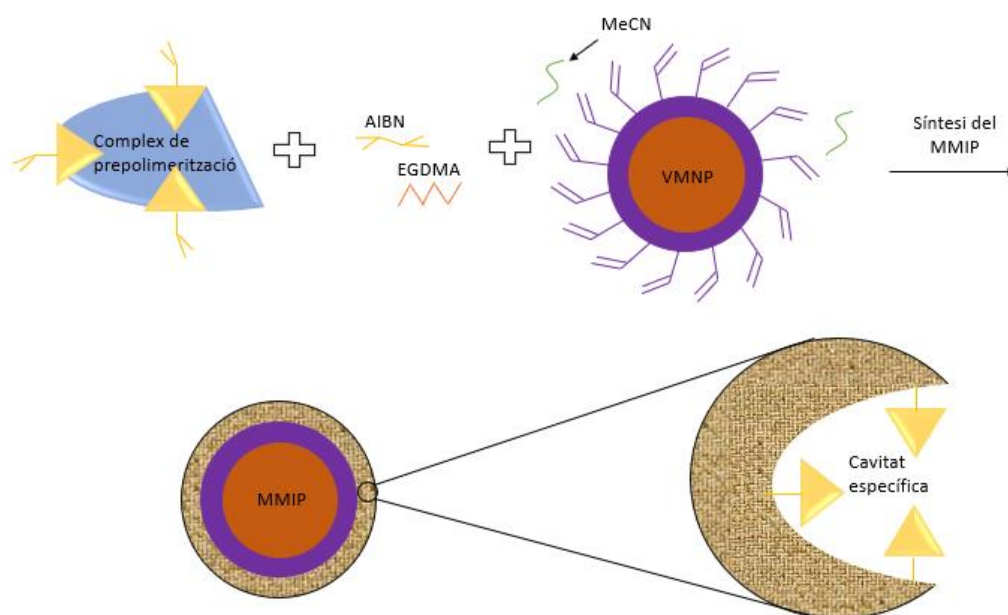


Figura 11. Polimerització del polímer d'empremta molecular damunt de les VMNPs. (Font: Pròpia)

### 1.5.2 Etapes del procés d'extracció MMISPE

El procés d'extracció MMISPE aconsegueix englobar els objectius principals d'una tècnica d'extracció com són l'eliminació d'interferències i la preconcentració dels anàlits, obtenint-se resultats robustos i reproduïbles. A més d'aquestes característiques, també conté un gran nombre d'avantatges. Com els adsorbents són dispersats a la mostra, aquest contacte directe proporciona una extracció més eficaç. A més, la reducció del nombre de passos en la preparació de la mostra pot millorar la precisió i exactitud del mètode, reduir el temps del procediment i minimitzar l'ús de dissolvents orgànics reduint els residus contaminants. Altre avantatge és que, en general, els sorbents són reutilitzables [16].



Les etapes del procés MMISPE son les següents (Figura 12):

- Condicionament del MMIP
- Addició de la mostra
- Separació del MMIP enriquit amb els analits d'interès
- Llavat del MMIP enriquit i separació del dissolvent de llavat
- Addició del dissolvent d'elució
- Separació del MMIP lliure d'analits i llavat del sorbent

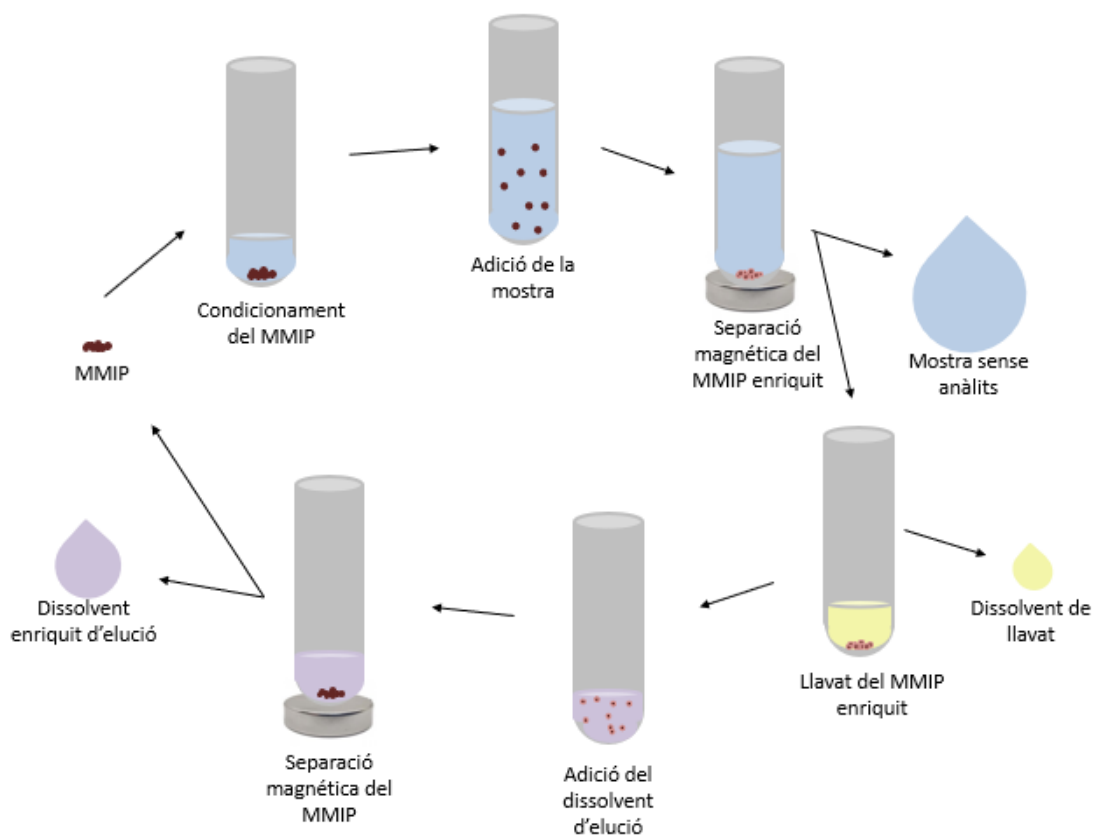


Figura 12. Procés i etapes del mètode MMISPE. (Font: Pròpia)

- *Condicionament del MMIP*

L'etapa de condicionament consisteix en afegir un dissolvent o mescla de dissolvents al MMIP per tal d'activar el sorbent i afavorir la posterior interacció entre els grups funcionals de l'MMIP i els analits d'interès. Aquesta etapa sols necessita uns segons i seguidament es retira el líquid.

- *Addició de la mostra*

La addició de la mostra es realitza directament, sense necessitat d'una etapa prèvia de preparació de la mostra. La mostra s'incorpora al recipient on tenim el sorbent, i aquest és dispersat per tota la mostra mitjançant agitació. El temps (temps d'adsorció) i velocitat d'agitació deuen ser els suficients per a què el MMIP adsorbsca els analits d'interès.

- *Separació del MMIP enriquit amb els analits d'interès*

Una vegada transcorregut el temps necessari per a l'extracció dels analits en qüestió, s'utilitza un imant de neodimi per a què el MMIP es depositi gràcies a les seues propietats magnètiques. A continuació, es decanta la mostra d'aigua lliure d'analits que passen a estar adsorbits a l'MMIP, el qual queda enriquit.

- *Llavat del MMIP enriquit i separació del dissolvent de llavat*

S'afegeix un volum xicotet d'un dissolvent que aconseguisca l'eliminació d'aquells composts units al polímer mitjançant interaccions no específiques.

- *Addició del dissolvent d'elució*

Prèviament a la elució, s'ha d'assecar el sorbent per a millorar el rendiment de l'extracció.

Sobre el MMIP enriquit i sec, s'afeg un volum d'un dissolvent o mescla de dissolvents adequat, aconseguint-se l'elució dels analits. Cal tenir en compte que el volum del dissolvent d'elució ha de ser el menor possible, per tal d'aconseguir concentrar al màxim l'analit i minimitzar la producció de residus. L'etapa d'elució requereix un volum mínim i un temps d'agitació (temps d'elució) per a poder realitzar l'extracció correctament.

- *Separació del MMIP lliure d'anàlits i llavat del sorbent*

El procés de separació del sorbent MMIP del dissolvent d'elució enriquit es du a terme també basant-se en les propietats magnètiques del sorbent. En aquest cas, es separa l'MMIP lliure d'anàlit, del dissolvent d'elució que conté els anàlits dissolts. El dissolvent d'elució passa a estudiar-se mitjançant el mètode analític escollit, i el MMIP s'ha de llavar adequadament per tal de poder re-utilitzar-lo [16].

## **2. CONTEXT**

Aquest treball és la continuació d'un treball previ realitzat en el mateix grup d'investigació per D. Roberto Beltrán Martí (*Desarrollo y aplicación de un polímero de impronta molecular para la extracción del Plaguicida MCPA en muestras de agua [12]*), i forma part del projecte d'investigació autonòmic "Sistemas de separación basados en nuevos polímeros porosos y composites polímero-nanopartículas con aplicaciones industriales y medioambientales" finançat per la Generalitat Valenciana, i el projecte "Desarrollo de materiales poliméricos funcionales en plataformas flexibles para aplicaciones medioambientales y toxicológicas" del Programa estatal de I+D+i per afrontar els reptes de la societat del Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats.

## **3. OBJECTIUS**

Els objectius principals d'aquest TFG són:

- Obtenir polímers magnètics d'empremta molecular per a MCPA i els seus corresponents polímers magnètics sense empremta.
- Seleccionar les condicions de llavat òptimes per a l'extracció selectiva de l'herbicida MCPA amb el MMIP.
- Avaluar la capacitat d'extracció de MMIP enfront d'altres herbicides de la família dels fenoxiàcids.
- Optimitzar les condicions d'adsorció i elució del procés d'extracció amb MMIP
- Establir el mètode cromatogràfic per a la separació i anàlisi del grup d'herbicides fenoxiàcids.
- Aplicar el procés d'extracció òptim amb MMIP combinat amb l'anàlisi cromatogràfic per a la determinació d'herbicides fenoxiàcids en mostres d'aigua de diferent procedència.

## 4. MATERIAL, REACTIUS I INSTRUMENTACIÓ

Per a la realització d'aquest TFG s'han emprat els següents **reactius químics**, de grau analític o superior:

- 4-VP
- Acetona
- AIBN
- Amoníac (30%)
- EGDMA
- Etanol
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Fenoxaprop
- $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q
- Haloxifop
- MCPA
- MCPB
- MCPP
- MeCN
- Metanol (MeOH)
- $\text{N}_2$  (gas)
- Oli de silicona
- VTMS

Les dissolucions mare dels herbicides fenoxiàcids (de 1000 mg/L) s'han preparat en MeCN; d'altra banda, les dissolucions de treball, amb les quals es van realitzar els estudis d'extracció en fase sòlida del MCPA i les mescles de herbicides, es preparaven amb aigua Mili-Q a la concentració adequada en cada experiment.

Per a la síntesi de les nanopartícules de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) i dels polímers MMIP i MNIP, així com per al dur a terme l'extracció i anàlisi dels herbicides, s'han emprat els següents **aparells i instruments de laboratori**:

- Agitador magnètic
- Agitador orbital
- Balança analítica
- Bany d'ultrasons
- Equip de filtració al buit
- Estufa
- Placa calefactora
- Sistema d'extracció Soxhlet

- Cromatògraf de líquids (Model Infinity 1200, Agilent Technologies) equipat amb una bomba quaternària amb desgasificador, un injector automàtic, un detector UV-vis de fila de díodes, una columna Kinetex C18 (Phenomenex, diàmetre intern 4.6 mm, longitud 10 cm, partícules de 2.6  $\mu\text{m}$  diàmetre), i un sistema informàtic de recollida de dades.

## 5. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

A continuació es descriu el procediment experimental per a la síntesi de les VMNPs, la síntesi dels polímers MMIP i MNIP i la seua neteja, el procediment d'extracció dels herbicides mitjançant MMISPE i l'anàlisi cromatogràfic dels pesticides. En aquest apartat es descriuen els procediments òptims, la majoria dels quals s'han establert al laboratori durant la realització d'aquest projecte. També s'inclou en aquest apartat el procediment de recollida, conservació i anàlisi de mostres d'aigua.

### 5.1 SÍNTESI DE LES VMNPs

L'obtenció de les nanopartícules magnètiques vinilitzades (VMNPs) requereix una primera etapa en la que es sintetitzen les nanopartícules magnètiques (MNPs), i una segona etapa en la que la magnetita es derivatitza amb VTMS. El procediment experimental d'aquestes etapes es detalla a continuació.

#### 5.1.1 Síntesi de les MNPs

Les MNPs s'obtenen fent reaccionar  $\text{FeCl}_2$  amb  $\text{FeCl}_3$  en medi bàsic, en calent i en atmosfera de  $\text{N}_2$ , tal com es descriu a continuació. Per a dur a terme la síntesi de la magnetita s'utilitza el sistema que es mostra a la figura 13, que consta d'un matràs de tres boques situat a l'interior d'un vas de precipitats que conté oli de silicona, el qual es situa sobre una placa calefactora. La temperatura de la silicona es controla amb una termòmetre digital i, tan a l'interior del matràs com del vas de precipitats, hi ha un imant agitador.



Figura 13. Muntatge per a la síntesi de les MNPs.

Per a la síntesi de les MNPs, es posen a l'interior del matràs 5.6 mmols de  $\text{FeCl}_2$ , 11.2 mmols de  $\text{FeCl}_3$  i 180 mL d'aigua mili-Q. A continuació, se submergeix el matràs en l'oli de silicona, i es posa en funcionament l'agitador magnètic per dissoldre els compostos. A través del tap d'una de les boques del matràs es passa un tub per bombollejar el  $\text{N}_2$  sobre la dissolució durant tot el procés; en la boca central es situa un sistema de refrigeració; i en la tercera entrada es situa un recipient que conté 12.5 mL d'amoníac al 30%, el qual s'afeg al matràs, per a què comence la reacció quan la temperatura de la dissolució del matràs siga de  $50^\circ\text{C}$ . Després, es manté la dissolució en agitació durant 30 min més a aquesta temperatura. I finalment, s'augmenta la temperatura a  $90^\circ\text{C}$  i es manté la reacció durant 30 min més. Una vegada finalitzat el procés de síntesi, s'extrau el matràs del vas i es deixa refredar a temperatura ambient.

Les MNPs sintetitzades s'han de llavar i assecar. Per poder eliminar la dissolució bàsica on es troben les nanopartícules, es situa un imant de neodimi a l'exterior del matràs que reté les MNPs al fons i facilita la decantació del dissolvent de reacció.

Les MNPs es llaven amb varies fraccions d'aigua mili-Q fins que el pH és neutre, i després amb varies fraccions d'etanol.

Finalment, les nanopartícules obtingudes es transvasen a un vas, on es sequen a  $60^\circ\text{C}$  durant 2h en una estufa.

### 5.1.2 Vinilització de les MNPs

La vinilització o funcionalització de les MNPs amb dobles enllaços terminals es du a terme en atmosfera de nitrogen, en el muntatge que mostra a la figura 14.



Figura 14. Muntatge per a la vinilització de les MNPs.

En primer lloc, s'afegeixen 0.5 g de MNPs i 125 mL d'etanol en el flascó de vidre, que es posa a ultrasons durant 15 min per dispersar les MNPs. A continuació, la dissolució es posa a agitar en atmosfera de N<sub>2</sub> i s'afegeixen 4 mL d'amoniac i 4 mL de VTMS; la mescla de reacció es manté en agitació durant 24 h mantenint en tot moment l'atmosfera de N<sub>2</sub>. Transcorreguda la reacció, les VMNPs es separen del dissolvent de reacció per decantació, fent ús d'un imant de neodimi, que es situa a l'exterior del recipient.

A continuació, es llaven les VMNPs en primer lloc amb aigua Milli-Q fins que el pH és neutre, i després varies vegades amb etanol. Finalment, les nanopartícules es sequen a una estufa sense aire, a 60°C durant 2 h. Una vegada seques, es molturen i es deixen al dessecador. En la figura 15 podem observar el resultat final de les VMNPs després d'haver sigut molturades.



Figura 15. Resultat final de les VMNPs.

## 5.2 SÍNTESI DE MMIP i MNIP

La síntesis del MMIP i del NMIP es du a terme en un vial de vidre de 15 mL. Tots el reactius es pesen amb la balança analítica en el vial i la polimerització es du a terme a 60°C a l'estufa durant 24 h. A continuació es detallen els procediments experimentals de síntesi d'ambdós polímers.

### 5.2.1 Síntesi i neteja del MMIP

Per a la síntesi del MIP s'empra habitualment una proporció *molècula plantilla:monòmer:entrecreuant* de 1:4:20 [17] i es la que s'ha utilitzat en aquest projecte per a preparar el MMIP. A la Taula 1 es mostren les quantitats dels reactius emprats per a la síntesis del MMIP, on MCPA és la molècula plantilla, 4-VP el monòmer, EGDMA l'agent entrecreuant, MeCN el porògen, AIBN l' iniciador i VMNPs les nanopartícules magnètiques vinilitzades.

Taula 1. Components per a la síntesis del MMIP i del MNIP

Compost	mmol	Massa / Volum	
		MMIP	NMIP
MCPA	0.2	0.0401 g	-
4-VP	0.8	0.0841 g	0.0841 g
EGDMA	4.0	0.7929 g	0.7929 g
AIBN	0.1	0.0164 g	0.0164 g
MeCN		10 mL	10 mL
VMNPs		0.05 g	0.05 g

La síntesis s'inicia amb la preparació del complex de pre-polimerització entre l'MCPA i el 4-VP. Per a això, en el vial s'afegeixen l'MCPA, el 4-VP i 4 mL d'MeCN. La mescla es posa en agitació orbital durant 2 h en obscuritat. En aquesta etapa s'estableixen les interaccions específiques entre el 4-VP i el MCPA. D'altra banda, en un altre vial, es dispersen les VMNPs amb 5 mL de MeCN agitant al bany d'ultrasons durant 1 h, mantenint en el procés la temperatura del bany a 25°C.



A continuació, es du a terme la polimerització. Per a això, s'addicionen l'AIBN, l'EGDMA i la dissolució de VMNPs, en aquest ordre, al vial de pre-polimerització. La mescla de polimerització s'agita durant 5 min al ultrasons, es bombolleja amb N<sub>2</sub> durant 10 min, i s'introdueix el vial tancat a l'estufa durant 24 h a 60°C. A la figura 16 es mostra una fotografia del MMIP sintetitzat al finalitzar la reacció de polimerització.



Figura 16. MMIP al finalitzar la polimerització.

Per últim, es du a terme la neteja del MMIP emprant un sistema Soxhlet com el que es mostra a la figura 17.

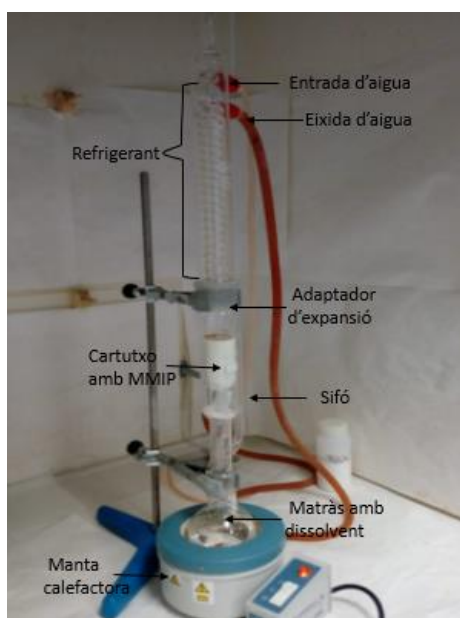


Figura 17. Muntatge del sistema Soxhlet per a la neteja del MMIP.

Per a netejar el MMIP sintetitzat amb el sistema Soxhlet, en primer lloc, el polímer del vial es pica i es transfereix, amb l'ajuda d'una espàtula i del dissolvent de llavat (MeOH:AcH 90:10), a l'interior d'un cartutx d'extracció fabricat en cotó pur de cel·lulosa.

Per una altra part, al matràs del Soxhlet s'introdueixen 150 mL de la mescla MeOH:AcH 90:10. Seguidament, es munta tot el sistema d'extracció Soxhlet, posant el tub de paper amb les VMNPs tal como es mostra a la figura 17, i s'encén la manta calefactora. De forma cíclica, la part on es troba el cartutx s'ompli de dissolvent, de manera que el MCPA que es troba retés al polímer MMIP passa a la dissolució i, aproximadament cada 10 min, es buida el cos al tornar el dissolvent pel sífó al matràs. El sistema Soxhlet es manté en funcionament unes 24 h, per assegurar la completa eliminació del MCPA del polímer. Després, s'extrau el cartutx del sistema i el MMIP net es seca a 60°C a l'estufa, es moltura i es guarda al dessecador.

### **5.2.3 Polimerització del MNIP**

La preparació del MNIP és similar a la del MMIP, però en absència de la molècula plantilla, pel que no serà necessària l'etapa de prepolimerització. Les quantitats de reactius per a la polimerització es mostren també a la Taula 1.

Per a la síntesi del MNIP, en primer lloc, es mesclen en un vial l'AIBN, el 4-VP i l'EGDMA, en aquest ordre. En altre vial, s'agregen les VMNPs amb 5 ml de MeCN i es dispersen durant 1 h al bany d'ultrasons.

A continuació, s'afeg la dissolució de les VMNPs al vial de reactius de polimerització amb ajuda d'una pipeta automàtica. Els 5 mL de MeCN restants s'utilitzen per a transferir quantitativament la dispersió de VMNPs. La mescla de polimerització es posa 5 min a l'ultrasons i es bombolleja amb N<sub>2</sub> durant 10 min. Finalment, s'introdueix el vial tancat a l'estufa per un període de 24 h a una temperatura de 60°C per dur a terme la polimerització.



Figura 18. Muntatge del sistema de filtració al buit per a la neteja del MNIP.

El polímer MNIP es pica i es transfereix, amb l'ajuda d'una espàtula i acetona (el dissolvent que s'empra per al llavat del MNIP), a l'equip de filtració per a la seua neteja (Figura 18). Es van afegint varies fraccions d'acetona, remonent amb l'espàtula per a afavorir el llavat i la filtració del dissolvent. El MNIP, que queda finalment dipositat sobre el filtre del sistema de filtració, es seca a una estufa a 60°C durant 1-2 h, es moltura i es guarda al dessecador.

## 5.4 PROCÉS D'EXTRACCIÓ MMISPE

Per a la realització del procés d'extracció MMISPE, es varen pesar 50 mg dels polímers sintetitzats (MMIP i MNIP) en tubs de polipropilè de 160 mL. El procediment optimitzat per a l'extracció dels 5 herbicides fenoxiàcids (MCPA, MCPP, MCPB, FEN i HAL) mitjançant MMISPE és el següent:

1. *Condicionament del sorbent.* El sorbent es condiona amb 2.5 mL d'aigua MilliQ, que es retira per decantació amb l'ajuda d'un imant de neodimi, tal com s'ha explicat en l'apartat d'introducció.
2. *Addició de la mostra.* S'afegeixen 75 mL de patró o mostra al tub que conté el sorbent (MMIP o MNIP). El tub es tapa i es manté en agitació orbital durant 1 h.
3. *Separació del MMIP/MNIP enriquit amb els analits d'interès.* El sorbent sòlid es separa de la dissolució per decantació.
4. *Llavat del sorbet enriquit.* El sorbent enriquit amb els fenoxiàcids es llava amb 0.50 mL de  $\text{NH}_3$  0.2 mmol/L; després d'agitar la mescla, el dissolvent de llavat es separa del sorbent per decantació, amb l'ajuda d'un imant de neodimi.
5. *Secat del sorbent enriquit.* El sorbent enriquit s'asseca a 60°C durant 15 minuts en una estufa.
6. *Elució dels herbicides fenoxiàcids.* Els herbicides es separen del sorbent al adicionar el dissolvent d'elució (2 mL de dissolució de MeOH:AcH 90:10). Per facilitar l'elució, aquesta etapa es du a terme amb agitació orbital durant 5 minuts.
7. *Separació del sorbent MMIP/MNIP del dissolvent d'elució que conté els fenoxiàcids.* Aquesta separació es realitza novament per decantació. La fracció de dissolvent d'elució que conté el herbicides es recull per al posterior anàlisi cromatogràfic.
8. *Neteja dels sorbents MMIP/MNIP.* Els sorbents, MMIP i MNIP, s'han de llavar per poder-los reutilitzar. El llavat es fa amb una fracció de 2 mL de mescla MeOH:AcH 90:10, 2 fraccions de 2.5 mL de MeOH i 2 fraccions de 2.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q.

## 5.5 ANÀLISI CROMATOGRÀFIC

Al finalitzar el procés d'extracció, el dissolvent d'elució que conté els herbicides es recull per a fer a continuació l'anàlisi cromatogràfic. Aquesta fracció s'ha de filtrar amb filtres de PTFE de 20  $\mu\text{m}$ , i dipositar en vials d'HPLC abans de l'anàlisi. Depenent de si la mostra contenia només MCPA o una mescla dels 5 herbicides fenoxiàcids, les condicions de l'anàlisi cromatogràfic han sigut diferents: per a l'anàlisi individual de l'MCPA s'ha utilitzat un programa isocràtic, mentre que per a analitzar la mescla dels 5 herbicides fenoxiàcids s'ha utilitzat un programa en gradient.

### 5.5.1 Anàlisi cromatogràfic individual de MCPA

L'anàlisi de les fraccions d'extracció que contenien únicament MCPA s'ha fet emprant una fase mòbil constant al llarg del temps d'anàlisi, que tenia un 55% d'àcid fosfòric ( $H_3PO_4$ ) 25 mmol/L i un 45% de MeCN. La velocitat de fluxe era de 1mL/min, el volum d'injecció de 20  $\mu$ L, i la longitud d'ona per registrar l'absorbància era 230 nm. La durada de l'anàlisi cromatogràfic de cada patró o mostra és de 5 min. Aquest procediment s'ha emprat únicament a l'estudi preliminar descrit en l'apartat de 6 "Resultats i discussió".

### 5.5.2 Anàlisi cromatogràfic d'una mescla de 5 herbicides fenoxiàcids

L'anàlisi de les fraccions d'extracció que contenien la mescla de 5 herbicides fenoxiàcids s'ha fet mitjançant un mètode cromatogràfic en gradient, en el qual la composició de la fase mòbil varia al llarg del temps d'anàlisi, tal com s'ha explicat en la *Introducció*.

La composició de la fase mòbil al llarg de l'anàlisi es mostra a la Taula 2. La composició inicial de la fase mòbil era del 20% de MeCN durant els primers 4 min; a continuació, la concentració de MeCN augmenta fins al 60% en 1 min, i es manté durant 5 min en aquest valor; per finalitzar, la concentració disminueix fins a 20% de MeCN en 1 min i es manté en aquest valor els 5 min restants per a estabilitzar el sistema abans de la pròxima injecció.

Taula 2. Composició de la fase mòbil al llarg de l'anàlisi amb el programa de gradient emprat per a l'anàlisi de la mescla dels 5 herbicides fenoxiàcids.

Temps d'anàlisi (min)	% $H_3PO_4$ 25mM	%MeCN
0	80	20
4	80	20
5	40	60
9	40	60
10	80	20
15	80	20

L'anàlisi cromatogràfic es va realitzar emprant una velocitat de fluxe de 1mL/min, un volum d'injecció de 20 µL, i una longitud d'ona de 230 nm; el temps d'anàlisi de cada patró o mostra era de 15 min.

## **5.6 RECOLLIDA, CONSERVACIÓ I ANÀLISI DE MOSTRES D'AIGUA**

L'aplicabilitat del mètode complet, MMISPE-HPLC, s'ha demostrat analitzant 6 mostres d'aigua de diferents orígens:

- Mostra 1: aigua embotellada de mineralització dèbil.
- Mostra 2: aigua potable d'osmosi.
- Mostra 3: aigua de font de la Font Roja, ubicat al parc natural del Carrascal de Font Roja, paratge protegit ubicat a la província d'Alacant.
- Mostra 4: d'aigua del Preventori, d'una font propera al naixement del riu Uxola, localitzat a la Ciutat d'Alcoi, província d'Alacant.
- Mostra 5: aigua d'un pou ubicat en una zona de camp de cultiu on s'utilitzen plaguicides i nutrients.
- Mostra 6: aigua que sorgeix de la Marjal de Gandia, localitzat en el nord-est del terme municipal de Gandia, província de València. Enclavament natural catalogat com Espai Natural Protegit i a més es troba inclòs en el Catàleg de Zones Humides de la Generalitat Valenciana. Es tracta d'un aqüífer detrític on les aigües subterrànies afloren a la superfície mitjançant Ullals.

Les mostres varen ser recollides en botelles de vidre de 1L, filtrades amb filtres Whatman 2.5 µm, i es va ajustar el pH de la mostra a 3 per a la seua conservació a 4°C.

Per a l'anàlisi de la presència d'herbicides FAs a les mostres es va aplicar el procés d'extracció MMISPE combinat amb HPLC a 75 mL de mostra. Per a l'estudi de validació de l'exactitud del mètode complet, MMISPE+HPLC, es varen analitzar per triplicat 75 mL de cadascuna de les mostres additivades amb 13 µg/L de mescla dels 5 herbicides.

## 6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats experimentals d'aquest TFG s'han organitzat en tres parts: la primera l'estudi de la selectivitat del MMIP respecte del MNIP en el procés MMISPE; la segona, l'optimització del procés d'extracció en fase sòlida magnètica; i la tercera, la validació del mètode d'anàlisi, que inclou estudis de linealitat, sensibilitat, precisió i exactitud del mètode complet MMISPE-HPLC, i la seua aplicació a l'anàlisi de mostres d'aigua.

Els resultats en els estudis realitzats en la primera i la segona part s'avaluen calculant el percentatge de recuperació (%Rec), què és la concentració del compost després d'aplicar tot el procés MMISPE-HPLC dividit per la concentració additivada al sorbent magnètic en l'etapa d'adsorció, i multiplicat per 100 (equació 1). Els estudis sempre s'han fet per triplicat, de forma que s'obté en cada cas el percentatge de recuperació mig i la seua desviació estàndard, (%Rec  $\pm$  s, n=3).

$$\%Rec = \frac{C_{després\ de\ MMISPE-HPLC}}{C_{inicial\ additivada}} \times 100 \quad (1)$$

### 6.1 ESTUDI PRELIMINAR

Per a analitzar i avaluar la recuperació obtinguda en cadascun dels assajos realitzats es compara l'àrea pic de la mostra o dissolució d'herbicides amb l'àrea pic del patró o blanc; les àrees dels pics s'obtenen automàticament mitjançant el programa software del HPLC.

#### 6.1.1. Selectivitat del MMIP front al MNIP

Aquest estudi preliminar es va realitzar únicament amb l'herbicida MCPA, ja que és el compost plantilla. L'objectiu d'aquest primer estudi era trobar les condicions d'extracció selectiva per al MCPA amb el MMIP. Les condicions d'extracció selectiva seran aquelles que afavorisquen les interaccions específiques MCPA-MMIP que proporciona l'empremta molecular generada en la síntesi del sorbent. L'empremta de l'MCPA a l'estructura del MMIP aconseguirà que l'analit no siga arrossegat en l'etapa de llavat, de manera que l'extracció és més efectiva. En aquest sentit, és essencial estudiar el dissolvent adequat per a l'etapa de llavat posterior a l'etapa d'adsorció de l'analit en el procés d'extracció. Si el dissolvent de llavat és l'adequat, s'afavoriran les interaccions MCPA-MMIP, i l'MCPA es quedarà retés al sorbent al emprar el MMIP, mentre que es perdrà en part al emprar el MNIP.

Per al procés d'extracció es va seguir el procediment descrit a l'apartat .1.5.2. "Etapas del procés d'extracció MMISPE" amb 50 mg de MMIP o MNIP, i amb algunes modificacions: 5 mL de dissolució de MCPA de 0.25 mg/L per a l'etapa d'adsorció, que es va fer en agitació orbital a temperatura ambient durant 5 min; addició de 1.5 mL de dissolució de llavat que es manté en agitació 3 minuts; secat a 70°C 15 min; i elució del MCPA amb 5 mL de MeOH:AcH (90:10) (agitació orbital durant 5 min).

Per al llavat s'han provat en aquest estudi preliminar diferents dissolucions: aigua mili-Q, MeCN, MeCN:aigua (90:10), MeCN:aigua (70:30), MeCN:aigua (50:50), MeOH, AcH (0.2mmol/L) i NH<sub>3</sub> (0.2 mmol/L).

Per a discernir quina condició aporta selectivitat a l'extracció, es calcula el factor de empremtació (IF), que s'obté de la fracció entre els valors de %Rec emprant el MMIP front al %Rec emprant el MNIP (equació 2):

$$IF = \frac{\%Rec (MMIP)}{\%Rec (MNIP)} \quad (2)$$

Els %Rec de MCPA amb el MMIP i el MNIP en cadascuna de les condicions de llavat emprades així com el valor del IF s'han representat a la figura 19. En la majoria de les dissolucions assajades els %Rec són lleugerament millors amb MMIP que amb MNIP. Però s'observa una clara diferència quan s'empra com a dissolvent de llavat NH<sub>3</sub> (0.2 mmol/ L), condició amb la qual el valor de IF és de 1.76. Aquesta etapa de llavat es mantindrà a la resta d estudis realitzats, i endavant, sols s'utilitzarà el sorbent selectiu MMIP.

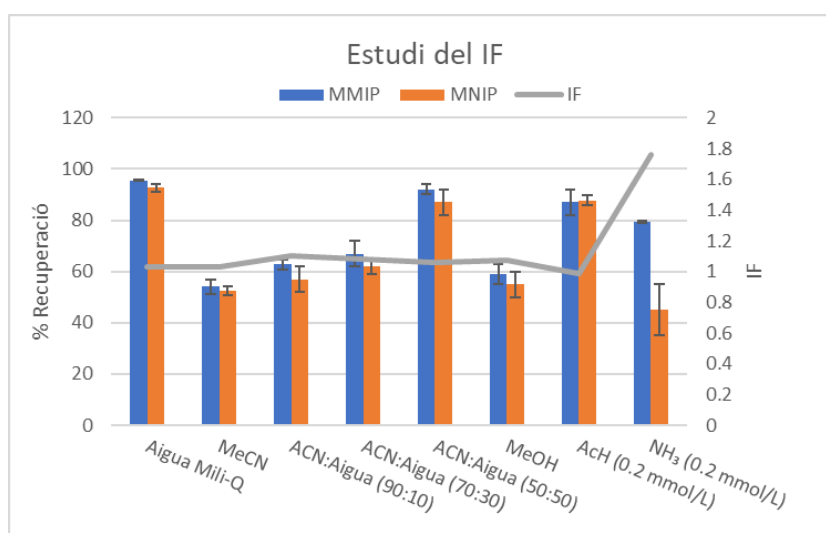


Figura 19. Percentatges de recuperació amb MMIP i MNIP, i IF, emprant distintes dissolucions de llavat en el procés d'extracció.



## 6.2. OPTIMITZACIÓ DEL MMISPE

Per a l'optimització del procés d'extracció MMISPE es van emprar dissolucions de mescla dels 5 FAs. El procediment d'extracció és similar al descrit a l'apartat 1.5.2 "*Etaques del procés d'extracció*" MMISPE però amb les modificacions que s'especifiquen en cadascun dels apartats. Generalment es va realitzar l'extracció amb 50 mg de MIP sobre 50 mL de mescla de fenoxiàcids (FA) amb la concentració adequada per a obtenir una concentració final de 0.3 mg/L de cada herbicida. L'etapa d'adsorció es va fer, habitualment, amb agitació orbital a temperatura ambient durant 30 min. L'etapa de llavat es va realitzar amb 0.5 mL de dissolució d'amoniac 0.2 mmol/L i, a continuació, es va assecat el sorbent magnètic a 70°C durant 10 min. Finalment, l'elució dels FAs es va fer amb 5 mL de MeOH:AcH (90:10) (agitació orbital durant 5 min). Després de l'extracció, la dissolució eluïda es passa per un filtre de PTFE i s'analitza cromatogràficament.

En primer lloc, es varen optimitzar els paràmetres de l'etapa d'adsorció (el temps, la temperatura, el pH de la mostra i la quantitat de sorbent) i el volum de ruptura, el volum màxim de la mostra que pot ser utilitzat sense que hi hagen pèrdues en la recuperació de l'anàlit. Després, es va optimitzar el volum de l'etapa d'elució. Finalment, es va establir la capacitat de reutilització del sorbent.

### 6.2.1. Estudi del temps d'adsorció

Com s'ha comentat, tot l'estudi d'optimització s'ha fet amb 50 mL de dissolució de mescla de FAs. En general, en els processos d'extracció, l'ús d'un volum més gran en l'etapa d'adsorció requereix d'un augment del temps d'adsorció. Per això, es va estudiar l'extracció amb 50 mL de mescla de FAs emprant diferents temps d'adsorció, entre 1 min i 1 h (Figura 20). S'observa a la figura que els percentatges de recuperació dels FAs augmentaren al augmentar el temps d'adsorció, obtenint-se recuperacions quantitatives per als 5 compostos amb 30 min d'adsorció, temps que va ser seleccionat per als posterior estudis.

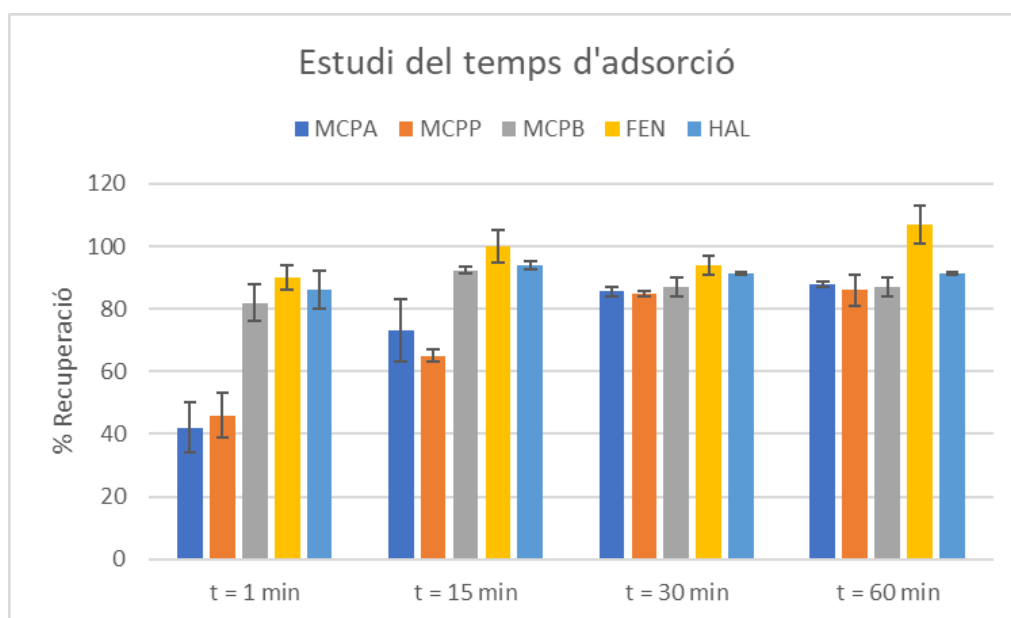


Figura 20. Estudi del temps d'adsorció.

### 6.2.2. Temperatura de l'etapa d'adsorció

En segon lloc, es va avaluar l'efecte de la temperatura en el percentatge de recuperació dels FAs. Les condicions d'extracció són les descrites abans, però l'etapa d'adsorció es va dur a terme a 20°C, 40°C i 60°C.

A la figura 21 es representa el percentatge de recuperació dels 5 FAs per a l'estudi de la temperatura. S'observa que l'augment de la temperatura de l'etapa d'adsorció influeix negativament en la recuperació dels plaguicides MCPA i MCPP, mentre que per a MCPB, FEN i HAL la recuperació és quantitativa en tots els casos. Amb aquests resultats, es selecciona la temperatura ambient com a condició de temperatura òptima per a l'etapa d'adsorció.

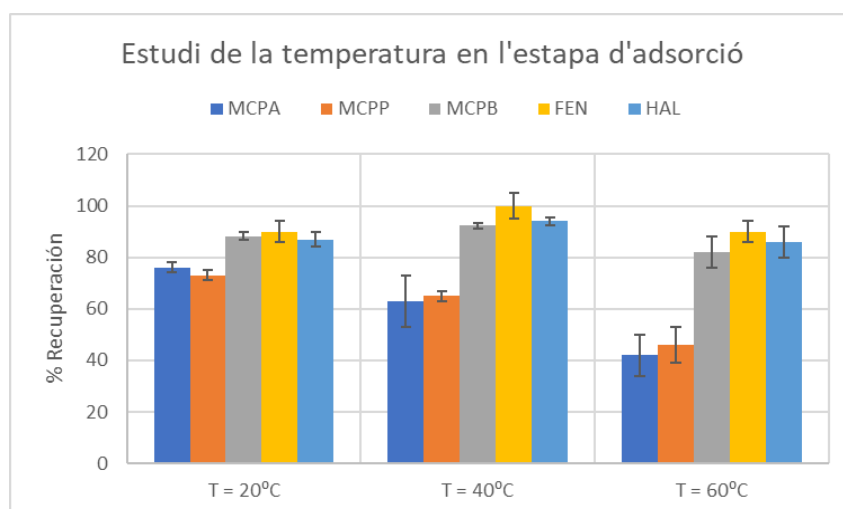


Figura 21. Estudi de la temperatura en l'etapa d'adsorció.

### 6.2.3. Estudi del pH de l'etapa d'adsorció

La variació en el pH de la mostra pot influir en l'adsorció dels FAs sobre el MMIP degut a les interaccions químiques que intervenen en el procés. En aquest estudi, es varen processar dissolucions de mescles dels 5 FAs a diferents pHs: 3, 4, 5, 6.5, 8.

Els resultats obtinguts per l'estudi es troben representats a la figura 22, on observem com el pH àcid afavoreix l'extracció dels FAs. El pH òptim és troba entre els valors 3-4, amb els quals s'obtenen els majors percentatges de recuperació per a tots els FAs. Açò es deu a què el pH àcid afavoreix les interaccions del grup àcid dels FAs amb el MMIP. A pHs superiors a 6.5, aquest grup àcid queda desprotonat i es perden part de les interaccions específiques. Degut als resultats obtinguts, es va seleccionar el pH 3 com a condició òptima per a l'etapa d'adsorció en els següents estudis.

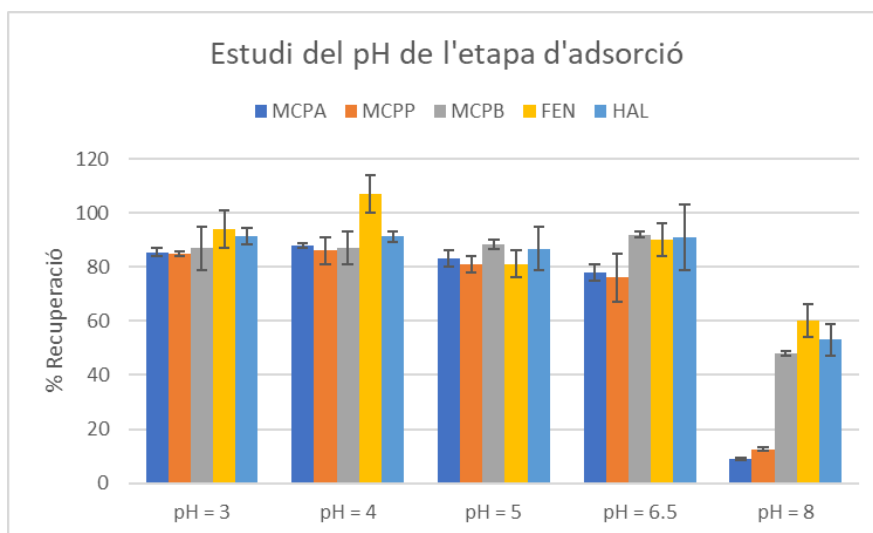


Figura 22. Estudi del pH de l'etapa d'adsorció.

#### 6.2.4. Estudi de la quantitat de sorbent MMIP

En aquest estudi es busca conèixer quina és la quantitat mínima de sorbent necessària per a obtenir una recuperació quantitativa dels 5 FAs. Les condicions d'extracció són les descrites abans, però emprant diferents quantitats de sorbent: 5mg, 15mg, 30mg i 50mg.

El percentatge de recuperació de cadascun dels 5 FAs per a les diferents quantitats de sorbent es mostra a la figura 23. S'observa que a partir de 30 mg de sorbent MMIP la recuperació ja és quantitativa per a tots els FAs. No obstant, donat que FEN i HAL milloren lleugerament la seua recuperació amb 50 mg de sorbent, es seleccionen 50 mg com a quantitat de sorbent òptima. Quantitats més grans de sorbent proporcionen recuperacions dels FAs menors ja que probablement la quantitat de dissolució eluent no és suficient.

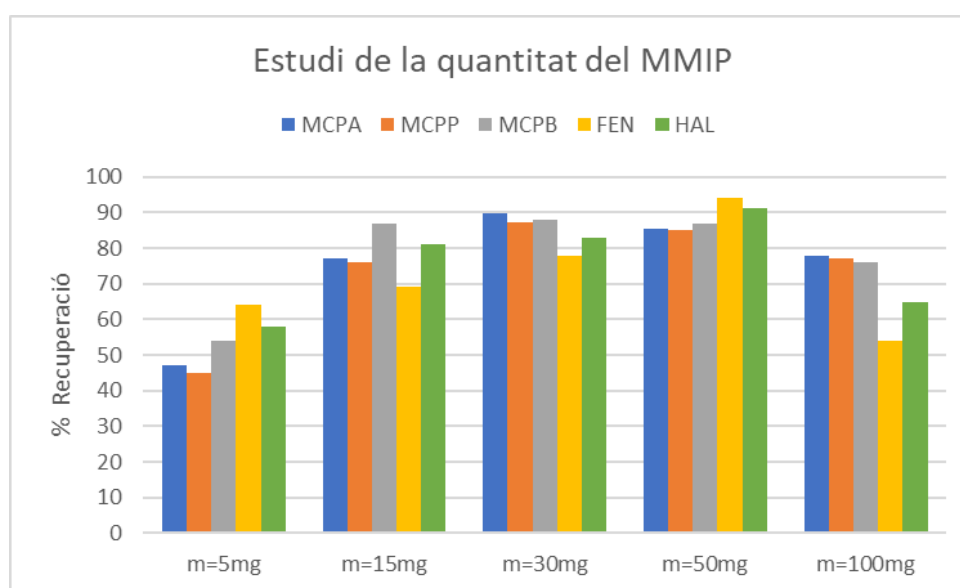


Figura 23. Estudi de la quantitat de sorbent MMIP.

### 6.2.5. Estudi del volum de ruptura

Aquest estudi permet conèixer el volum màxim de mostra amb el qual es pot treballar aconseguint recuperacions dels FAs quantitatives, el que s'anomena volum de ruptura. Aquest estudi és essencial ja que quant més gran és el volum de mostra que es pot emprar en l'etapa d'adsorció i més menut és el volum d'elució, es podrà aconseguir una major preconcentració de la mostra en l'etapa d'extracció.

Les condicions d'extracció emprades en aquest estudi són les descrites abans, però emprant diferents volums de dissolució mescla de FAs, entre 5-100 mL, mantenint constant la quantitat d'herbicida (1 µg de cadascun dels FAs). Aquest estudi es va fer emprant com a temps d'adsorció 1 h ja que es pretenia emprar volums de mostra grans i es sabia que a major volum de mostra es necessitava major temps d'adsorció.

A la figura 24 es representa el %Rec per a cada FA als diferents volums de mostra estudiats. S'observa una recuperació quantitativa per als 5 FAs fins a un volum de 75 mL i, a partir d'aquest volum, els percentatges de recuperació cauen significativament per a MCPA i MCPB. D'aquesta manera, es seleccionen 75 mL (i 1 hora d'adsorció) com a volum òptim per a l'anàlisi de mostres reals.

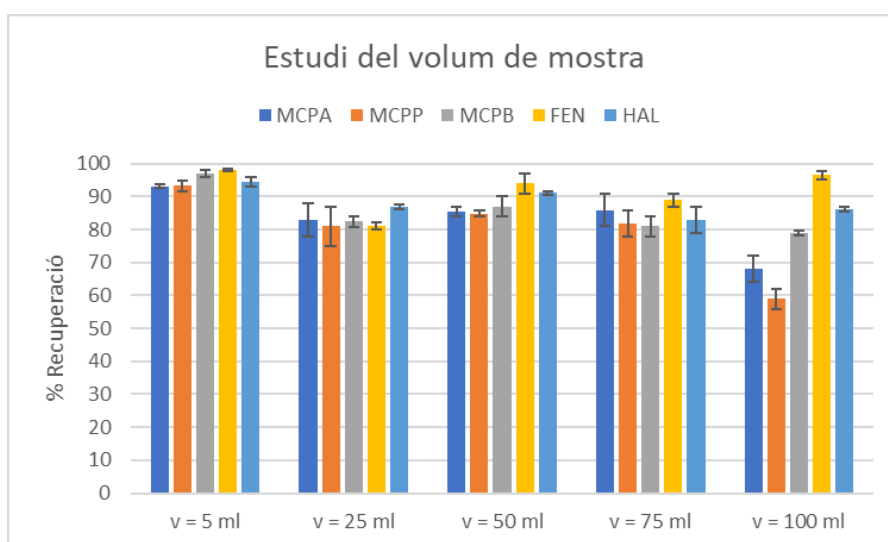


Figura 24. Estudi del volum de mostra.

### 6.2.6. Volum de dissolució per a l'etapa d'elució

En aquest apartat es pretén conèixer el mínim volum de dissolvent orgànic necessari per a la elució quantitativa dels 5 FAs. L'estudi del volum d'elució emprat en el procés d'extracció junt amb l'estudi anterior del volum de ruptura són importants perquè permetran determinar el Factor de Concentració aconseguït amb la tècnica MMISPE proposada.

El Factor de concentració (FC) es defineix com el Volum de de mostra processada en l'etapa d'adsorció ( $V_{mostra}$ ) entre el volum d'eluent emprat ( $V_{eluent}$ )(equació 3).

$$FC = \frac{V_{mostra}}{V_{eluent}} \quad (3)$$

A més, la selecció del volum d'elució mínim permet reduir la generació de residus del procés.

Per a la selecció del volum d'elució òptim les condicions d'extracció emprades són les descrites abans, però emprant diferents volums de dissolució eluent (MeOH:AcH 90:10), entre 1-5 mL. El percentatges de recuperació dels 5 FAs per a cada volum d'elució es troben representats a la figura 25. S'observa que el volum d'elució de 1 mL aporta valors de recuperació molt pobres, pel que aquest volum queda descartat. D'altra banda, a partir d'un volum de 2 mL s'aconsegueixen recuperacions quantitatives per als 5 FAs, pel que aquest volum es selecciona com a volum d'elució òptim.

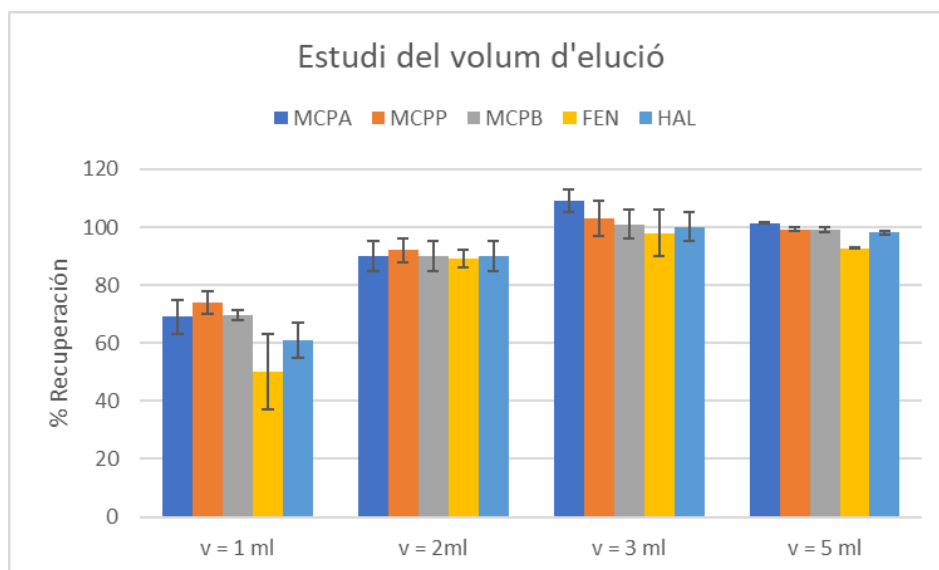


Figura 25. Estudi del volum de dissolució d'elució.

### 6.2.6. Reutilització del sorbent

La capacitat de reutilitzar el sorbent per a un nombre definit d'extraccions és una característica important a estudiar. A la figura 26 s'observa el %Rec dels 5 FAs obtés al llarg dels usos realitzats amb el mateix sorbent.

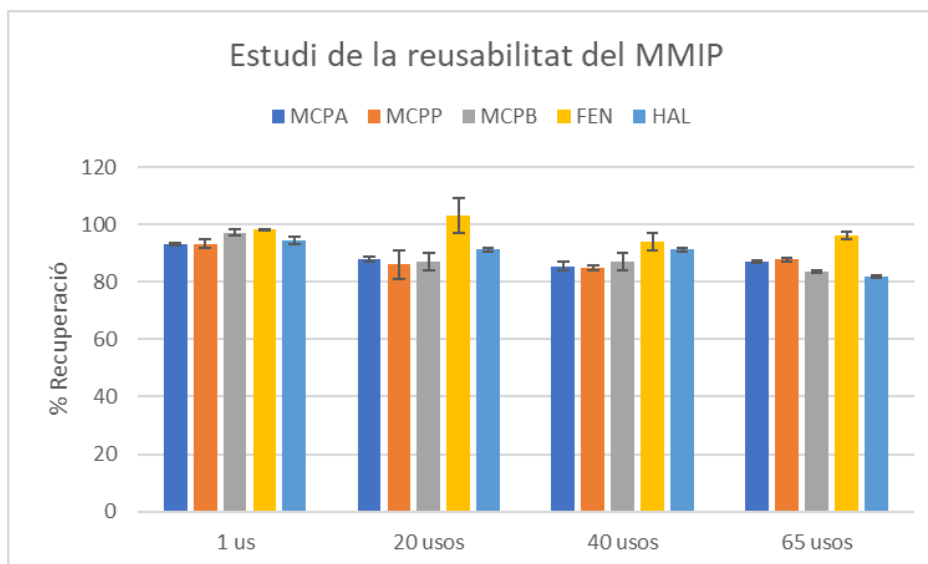


Figura 26. Estudi de la reutilització del MMIP.

En la gràfica anterior es percep una reducció del %Rec al augmentar el nombre d'extraccions realitzades amb el mateix sorbent. Aquesta disminució és molt lleugera, i en cap dels FAs la recuperació disminueix del 80%, el que es considera recuperació quantitativa. Així, s'ha demostrat que el mateix sorbent es pot reutilitzar fins a 65 vegades sense tenir pràcticament pèrdues en la recuperació dels FAs.



### 6.3. MÈTODE MMISPE-HPLC

Després d'aplicar el procediment òptim MMISPE, l'anàlisi de les fraccions d'elució es du a terme mitjançant cromatografia líquida amb un mètode de gradient tal com s'ha indicat en l'apartat 1.3 "Cromatografia". En la figura 27 es mostra el cromatograma corresponent a una mescla dels 5 herbicides de 0.3 ppm. En el mètode cromatogràfic emprat es registren els distints FAs als temps de retenció, 3.7 min per a MCPA, 4.5 min per a MCPP, 5.0 min per a MCPB, 6 min per a FEN i 6.5 min per a HAL.

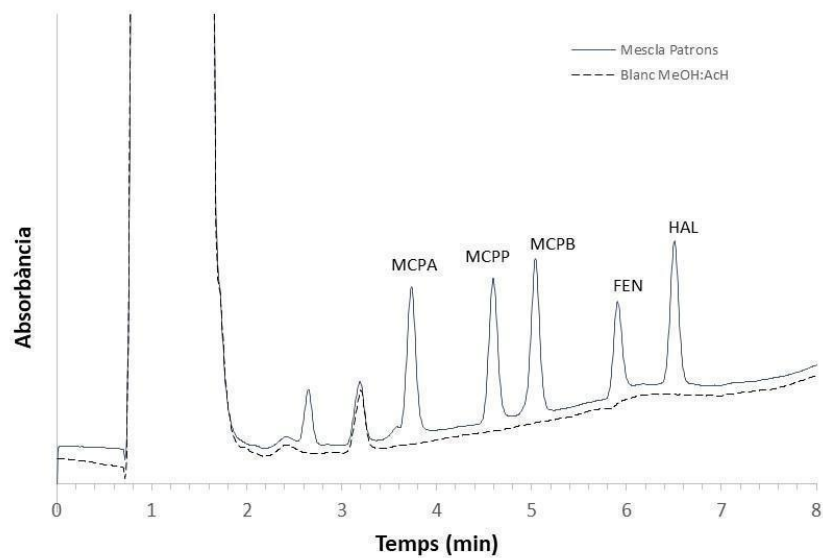


Figura 27. Cromatogrames d'una mescla dels 5 herbicides FA i del blanc obtinguts amb el programa cromatogràfic de gradient.

### 6.3.1. Linealitat i sensibilitat del mètode MMISPE-HPLC

En aquest apartat s'avalua la linealitat, els límits de detecció i quantificació, i la precisió del mètode MMISPE-HPLC complet per a l'anàlisi dels 5 fenoxiàcids.

La linealitat s'avalua mitjançant l'obtenció de les rectes de calibratge. Les rectes de calibratge s'obtenen per a cada compost confrontant l'àrea pic del compost (obtesa del cromatograma) front a la concentració de l'anàlit d'interès. Aquestes equacions lineals, Àrea de pic vs Concentració (mg/L), permetran l'anàlisi dels herbicides en mostres de concentracions desconegudes.

L'estudi del límit de detecció (LD) i el límit de quantificació (LQ) permet avaluar la sensibilitat del mètode. El límit de detecció és la mínima concentració d'anàlit a la mostra necessària per a poder discernir la seua senyal al cromatograma del soroll de fons (concentració experimental que proporciona una relació Senyal/Soroll de 3). I per altra part, el LQ és la concentració mínima d'anàlit que es pot quantificar amb fiabilitat (concentració experimental que proporciona una relació Senyal/Soroll de 10) [18].

La recta de calibratge i els valors de LD i LQ es troben resumits a la Taula 3 per a cada anàlit estudiat. La correlació lineal entre l'àrea pic i la concentració és de  $r > 0.999$  per als 5 FAs, i els límits de detecció i quantificació, que es calculen tenint en conter el factor de concentració que aporta el procés MMISPE, corresponen a concentracions inicials dels herbicides de l'ordre de ppb ( $\mu\text{g/L}$ ).

Taula 3. Recta de calibratge, LD i LQ per als 5 herbicides FAs estudiats.

Anàlit	Recta de calibratge Àrea vs Concentració (mg/L)	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )
MCPA	$\text{Àrea} = -(0.5 \pm 0.3) + (54.8 \pm 0.7) \cdot C_{MCPA}$	0.33	1.1
MCPP	$\text{Àrea} = -(0.3 \pm 0.2) + (49.9 \pm 0.4) \cdot C_{MCPP}$	0.33	1.1
MCPB	$\text{Àrea} = -(1.2 \pm 0.4) + (57.0 \pm 0.8) \cdot C_{MCPB}$	0.48	1.6
FEN	$\text{Àrea} = (0.8 \pm 0.4) + (44.2 \pm 0.8) \cdot C_{FEN}$	0.71	2.4
HAL	$\text{Àrea} = (0.00 \pm 0.17) + (48.0 \pm 0.3) \cdot C_{HAL}$	0.53	1.8

### 6.3.3. Validació de l'exactitud del mètode MMISPE-HPLC

Per a validar l'exactitud del mètode MMISPE-HPLC s'ha aplicat al mètode a l'anàlisi de 6 mostres d'aigua de diferent procedència, com s'ha explicat al apartat 5.6 "Recollida, conservació i anàlisi de les mostres d'aigua". Les mostres s'han additivat amb la mescla dels 5 herbicides (per triplicat) i s'ha calculat el % de recuperació de la quantitat additivada després d'aplicar tot el procés MMISPE-HPLC optimitzat en aquest treball.

La figura 28 mostra els %Rec per a cada compost per a les diferents mostres analitzades. Els percentatges de recuperació foren en tots els casos quantitius per a tots els compostos i en totes les mostres analitzades (%Rec >77%). Amb això, l'exactitud de la determinació d'herbicides fenoxiàcids emprant el mètode MMISPE-HPLC proposat queda validada.

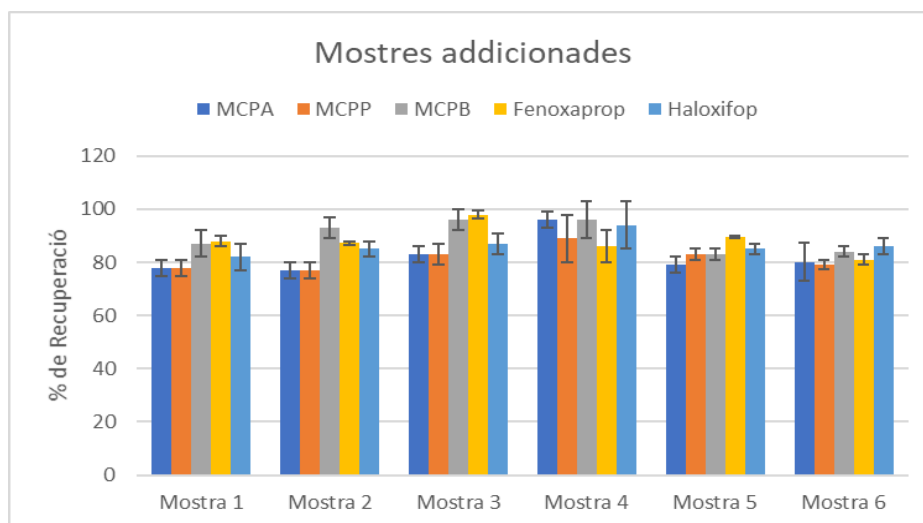


Figura 28. Recuperació dels plaguicides en les mostres.

### 6.3.4 Anàlisi de la presència d'herbicides fenoxiàcids a les mostres d'aigua

Les mostres d'aigua emprades també s'han analitzat (sense additivar) després del procés MMISPE-HPLC complet per tal d'avaluar la presència d'herbicides fenoxiàcids (blancs de mostra). En l'anàlisi es va comprovar si al cromatograma del blanc de mostra apareixia algun pic que coincidia amb els temps de retenció dels herbicides estudiats.

A més del temps de retenció, per comprovar si els pics que apareixen al cromatograma del blanc de mostra es corresponen amb els dels herbicides estudiats, es va comparar l'espectre UV-vis del pic detectat en la mostra amb el espectre de l'herbicide corresponent, per a comprovar si realment es tracta del mateix compost. Si els espectres coincideixen i l'àrea del pic en la mostra és superior a LQ, es podrà quantificar la concentració de l'herbicide a la mostra. I si l'àrea del pic correspon a una concentració entre LD i LQ, sols podrem dir que s'ha detectat el compost però no quantificar-lo.

En algunes de les mostres s'ha detectat algun pic al temps de retenció d'algun dels FAs inclosos en el estudi. En alguns casos, els pics no es corresponen a cap del FAs, perquè els seus espectres UV-vis són completament diferents. Quan els espectres són similars i no podem descartar la presència d'algun herbicide fenoxiàcid a la mostra, en un cas la concentració va ser menor del LD (MCPB mostra 5) i, en altres, menor del LQ (MCPP mostres 3, 5 i 6). En la figura 28 es mostra un cromatograma de la mostra de marjal additivada i sense additivar, i es pot observar la presència d'un pic xicotet al temps de retenció del MCPP, que correspon a una concentració menor del LQ del mètode.

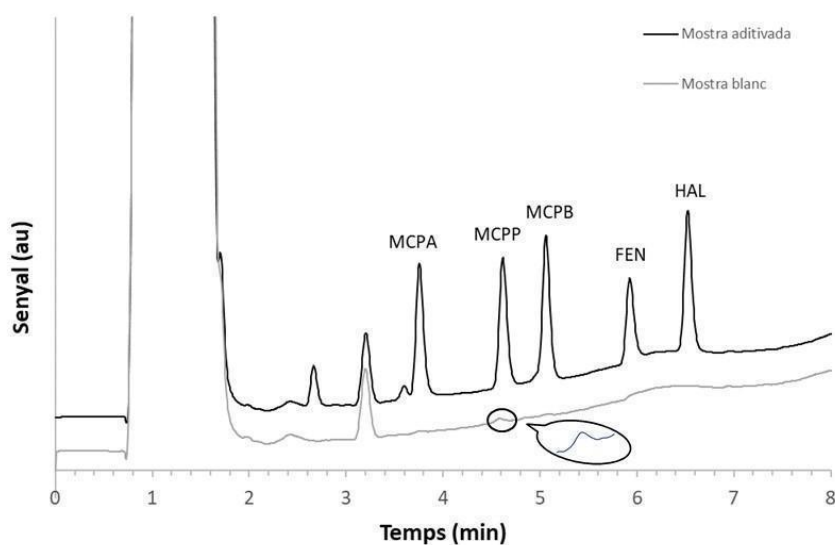


Figura 28. Cromatograma de la mostra 6 (marjal) sense additivar (a) i additivada amb la mescla dels 5 herbicides fenoxiàcids

## 7. CONCLUSIONS

S'han sintetitzat un polímer amb empremta molecular (MIP), amb MCPA com a molècula plantilla, i el seu corresponent polímer sense empremta (NIP) sobre nanopartícules de magnetita sintetitzades i derivatitzades amb grups vinil al laboratori.

Encara que l'adsorció dels herbicides fenoxiàcids es produeix tant al MNIP com al MMIP, per a que l'extracció d'anàlit es realitzi únicament per interaccions selectives, s'ha inclòs en el procés d'extracció una etapa de llavat prèvia a l'etapa d'elució, amb una dissolució 0.2 mM de NH<sub>3</sub>. D'aquesta manera, s'han eliminat les interaccions no específiques i MMIP ha mostrat una retenció del compost plantilla (MCPA) clarament millor que el MNIP. Aquesta conclusió ha sigut reforçada amb el càlcul del IF, el qual presenta un valor de 1.76 per la MCPA.

Una vegada coneguda l'eficiència d'extracció del MMIP amb tots el fenoxiàcids, es realitza l'optimització del procés d'extracció, MMISPE. En el procés òptim, el volum màxim de mostra es de 75 mL amb un pH de 3, l'extracció es realitza amb 50 mg de MMIP amb agitació orbital durant 1 h. L'etapa de llavat es realitza amb 0.5 mL de dissolució d'amoníac 0.2 mmol/L, seguida del assecat del sorbent a 70°C durant 10 min. Finalment, l'elució dels FAs es fa amb 2 mL de MeOH:AcH (90:10), de manera que el factor de concentració del procés d'extracció és de 37.5 vegades.

La alíquota extreta del MMISPE es va analitzar mitjançant el mètode analític HPLC; depenent de si hi ha un compost o diversos es treballa la fase mòbil en isocràtic o en gradient.

S'ha estudiat la linealitat i sensibilitat del mètode HPLC-MMISPE, que combina el mètode d'extracció optimitzat amb el mètode d'anàlisi per HPLC. S'han validat la precisió i l'exactitud del mètode MMISPE-HPLC per a el anàlisi de la mescla dels 5 herbicides fenoxiàcids en mostres d'aigua. A més, s'ha demostrat l'aplicabilitat del mètode analitzat 6 mostres d'aigua de diferent procedència (aigua embotellada, aigua d'osmosi, aigua d'una font natural, aigua de la Font Roja, aigua de pou, i aigua de la Marjal de Gandia). Aquestes mostres, additivades amb la mescla de FAs, han proporcionat percentatges de recuperació propers al 80% per als 5 compostos en les 6 mostres estudiades. D'altra banda, en cap de les mostres s'han trobat FAs a concentracions superiors al LQ.

El mètode HPLC-MMISPE desenvolupat és sensible, selectiu i senzill, ja que evita la realització de etapes de tractament de mostres més costoses, com la centrifugació requerida en els mètodes d'extracció dispersiva clàssics o la utilització de cartutxos en els mètodes de SPE. A més, el sorbent MMIP es pot utilitzar més de 65 vegades sense pèrdua significativa de la seua capacitat d'absorció dels FAs. Els resultats mostren que el MMIP sintetitzat es un material prometedor per a la extracció dels FAs a nivell traça de mostres d'aigua.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Prado, R. i M.D. Osuna, *Resistencia a herbicidas. Detección en Campo y Laboratorio*. Congreso 1999 de la SEMh, Tema 9. Logroño (1999).
- [2] E.A. Della-Valle-Vivo i J.F. Ferrari-Galloti, *Susceptibilidad de Lolium multiflorum Lam. A aplicaciones de glifosato en rastrojos de cultivos de verano*, (2011) [Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad de la República].
- [3] S. Meseguer-Lloret, S. Torres-Cartas, M. Catalá-Icardo, C Gómez Benito, Selective and sensitive chemiluminescence determination of MCPB: flow injection and liquid chromatography. *Applied Spectroscopy*. 70(2) (2016) 312-321. doi:10.1177/0003702815620133.
- [4] MCPA. Portal Tecnoagrícola. <https://www.buscador.portalteconoagricola.com/vademecum/esp/producto-tecnico/1077/MCPA> [8/4/2021]
- [5] Haloxifp-p. Manual de plaguicidas de centro américa. [Instituto regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional Heredia] <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/310-haloxifop-p> [12/4/2021]
- [6] Gomis Yagües, V. Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial* (2008).
- [7] Técnicas cromatográficas. Tema 6. [Universidad de Jaén] [http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia\\_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf](http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf) [6/6/2021]
- [8] La cromatografía. Sociedad Española de Cromatografías y Técnicas Afines <https://www.secyta.es/es/node/25> [6/4/201]
- [9] E. Gonzalez.,Y. Cayupán, M. Nazareno, “Efecto de distintos tratamientos de conservación en la actividad antirradicalaria de alcaparras (*Capparis spinosa L.*) cultivadas en Santiago del Estero, Argentina” *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol 1 (2010)
- [10] Soledad-Rodríguez, Beatriz. Empleo de Polímeros de Impronta Molecular como pre-Concentradores de muestras en el análisis químico de trazas. *Revista Tekhné*. 20. 3-22. (2017).
- [11] Carrasco-Garrido, S. Polímeros de impronta molecular micro y nanoestructurados para la fabricación de sensores ópticos (2017) [Tesis en Química, Universidad Complutense de Madrid]
- [12] R. Beltrán Martí, *Desarrollo y aplicación de un polímero de impronta molecular para la extracción del plaguicida MCPA en muestras de agua* (2019) Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/126134> Roberto
- [13] Díaz-Álvarez, M., Turiel, E., & Martín-Esteban, A. EMPLEO DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIPs) EN TÉCNICAS DE MICRO-EXTRACCIÓN.

[14] Ibarra Ortega, I. S. Aplicación de extracción en fase sólida magnética acoplada a sistemas de separación instrumentales para el análisis de residuos de antibióticos en leche. (2013).

[15] da Silva, A. K., Sobieski, E., Viana, L. H., Lanças, F. M., & Nazario, C. E. D. Extração em fase sólida magnética (MSPE): fundamentos e aplicações. *Sci. Chromatogr.*, 8, 239-256. (2016).

[16] Fernández Martínez, E. Nuevos avances en metodologías analíticas basadas en técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida y en fase líquida. (2017).

[https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/73173/1/tesis\\_elena\\_fernandez\\_martinez.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/73173/1/tesis_elena_fernandez_martinez.pdf)

[17] E. Herrero-Hernández, R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, *Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection*, *Anal. Chim. Acta.* 650 (2009) 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.043>

[18] Daniel C. Harris, *Anàlisi Química Quantitativa*, Editorial Reverte; 1 edició (1 enero 2006) (ISBN 978-8429172232)