

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



TESIS DOCTORAL

Nuevos desarrollos metodológicos en SPME

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

John Jairo Ríos Acevedo

DIRECTORES

**Luis M^a Polo Díez
Nour Kayali Sayadi**

Madrid, 2017



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**NUEVOS DESARROLLOS
METODOLÓGICOS EN SPME**

John Jairo Ríos Acevedo
Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**NUEVOS DESARROLLOS
METODOLÓGICOS EN SPME**

JOHN JAIRO RÍOS ACEVEDO

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor
en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid

Directores:

Catedrático, Luis M^a Polo Díez

Departamento de Química Analítica
Facultad de CC. Químicas
Universidad Complutense de Madrid

Dr. Nour Kayali Sayadi

CAI de Espectrometría de Masas
Facultad de CC. Químicas
Universidad Complutense de Madrid

Madrid 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria, 28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 43 31 Fax: 91 394 43 29

Luis María Polo Díez, Catedrático del Departamento de Química Analítica y Director del CAI de Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Nour Kayali Sayadi, Doctor en Ciencias Químicas y Responsable técnico del CAI de Espectrometría de Masas de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “*NUEVOS DESARROLLOS METODOLÓGICOS EN SPME*” ha sido realizado en los Departamentos de Química Analítica y en el CAI de Espectrometría de Masas de la UCM bajo nuestra dirección, constituyendo la TESIS DOCTORAL de su autor.

Dr. Luis María Polo Díez

Dr. Nour Kayali Sayadi

MADRID, 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque es el ser que me provee de la fuerza, la dedicación, la inteligencia y las oportunidades de mi vida.

Quiero agradecer a mi familia ofreciéndome su amor y afecto que son los soportes más importantes de la vida; a Lorena, por el apoyo incondicional, por ser como eres y por tener la suerte de compartir mi vida contigo; a mis hijos Sebastián y Esteban que me ayudan a valorar lo realmente importante en la vida.

A mis padres el cómo viven y han vivido para sus hijos y nietos y el haberme inculcado el sentido de esfuerzo, responsabilidad y sacrificio. Sin ellos, este trabajo nunca hubiera sido posible.

Además, mi hermana Johana por su apoyo incondicional y a mis sobrinos (Juan José y Mariana) y con los que tan buenos momentos he pasado y que tanto cariño les tengo.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de Tesis, el Dr. Luis María Polo Díez y el Dr. Nour Kayali Sayadi, por brindarme su amistad y la oportunidad de llegar hasta aquí; por su apoyo y dedicación a este trabajo y sobre todo por sus aportes y enseñanzas que han marcado mi vida profesional.

A mis compañeras de laboratorio Cristina y Amparo por los buenos momentos pasados y por su inestimable ayuda sin la que este trabajo tampoco hubiese sido posible.

También, quiero dar las gracias a La universidad de Complutense de Madrid por permitir la posibilidad de recibir tan importante formación a nivel de posgrado, al Departamento de Química Analítica y al CAI de masas que contribuyó en el trabajo que aquí se presenta.

Por último, a todas aquellas personas que de una u otra forma intervinieron y aportaron a mi trabajo y a mi vida personal.

A mi familia

RESUMEN.

La Microextracción en fase sólida (SPME) ha experimentado un rápido desarrollo desde su introducción hace más de 20 años teniendo un gran impacto sobre las prácticas de muestreo y preparación de muestra en áreas como análisis químico, bioanálisis, los alimentos y las ciencias ambientales. Sin embargo, en otras áreas como análisis clínico, ciencias farmacéuticas y médicas, se espera un crecimiento en sus aplicaciones. El objetivo fundamental de la presente investigación ha sido la implementación de nuevas metodologías mediante la técnica de SPME.

En el primer estudio, se modifica la interfase comercial SPME-HPLC, la cual fue adaptada para realizar una extracción dinámica en línea de los analitos de la muestra sobre la fibra con desorción mediante aplicación de vibración en la interfase durante ambos pasos de extracción y desorción. Para la optimización, se eligieron como compuestos prueba hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs), en concreto catorce, los cuales fueron detectados por fluorescencia. Se analizaron muestras de agua del Pantano San Juan y del río Guadalix. La interfase fue validada por comparación de los resultados con los obtenidos mediante el método de referencia 550.1 de la EPA. La extracción dinámica mostró buena sensibilidad respecto al método de referencia, no

existiendo diferencias significativas entre ambos métodos al nivel de probabilidad del 95%.

En la segunda parte de la tesis, se desarrolla una interfase SPME/HPLC Off-Line, en la cual el proceso de desorción de los analitos en la fibra se lleva a cabo térmicamente lo cual evita el contacto de la fibra con los disolventes orgánicos de la fase móvil; recolectándolos después de la desorción en una mezcla de disolventes orgánicos para posteriormente ser inyectados en el cromatógrafo de HPLC con detector de fluorescencia. Entre las ventajas que posee esta nueva interfase off-line es que se protege la fibra de posibles daños por contacto, que ocurren al utilizar la interfase comercial on-line para HPLC. Para la optimización de la interfase se eligieron como compuestos "tests" cinco PAHs. Se analizaron muestras de agua del Pantano de Valdemayor y del río Guadalix. La interfase fue validada comparando los resultados con los obtenidos mediante el método de referencia 550.1 de la EPA, no existiendo diferencias significativas al nivel de probabilidad del 95%.

La tercera parte de tesis aborda la problemática de los vertidos ilegales en las fuentes hídricas; se diseñó un dispositivo de muestreo para la microextracción en línea que consta de una caja de acero recubierta con malla de acero y en el interior un soporte con cuatro fibras; dicho dispositivo se sumerge en aguas de rios durante un tiempo de tres días, lo que le permite realizar un muestreo dinámico e identificar posibles vertidos industriales en los

afluentes. En este estudio se analizaron aguas de los ríos Manzanares y Jarama, permitiendo la detección e identificación de muy diversos compuestos orgánicos en aguas de dichos ríos.

Por último, se evalúa el interés potencial de un marcador en muestras de orina de madres gestantes utilizando la técnica de HS-SPME-GC-MS; este marcador permitió determinar el sexo del feto en el primer trimestre de gestación con un 94% de acierto en una muestra de 36 mujeres gestantes. La consolidación de este marcador requiere realizar un estudio más completo, analizando un número de muestras de orina más representativo a nivel estadístico.

ABSTRACT

The solid phase micro extraction (SPME) has experienced rapid development since its introduction more than 20 years ago having a great impact on sampling and sample preparation areas such as chemical analysis, bioanalysis, food and environmental sciences. However, in other areas such as clinical analysis, pharmaceutical sciences and medical applications a significant increase in its applications is expected. The main objective of this research has been the implementation of new methodologies by SPME technique.

In the first study, a commercial SPME-HPLC interface was modified for on-line dynamic extraction of the analytes from the sample onto the fiber with desorption by the interface vibration during the steps of extraction and desorption. For optimization of the method, polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) were selected as test compounds, in particular fourteen ones which were detected by fluorescence. Water samples of San Juan Reservoir and River Guadalix were analyzed. The interface was validated by comparing the results with those obtained using the reference method EPA 550.1. The dynamic extraction method showed good sensitivity compared to the reference one, without existing significant differences between the two methods at the 95% probability level.

In the second part of this thesis develops a SPME / HPLC Off-Line interface was developed, where the desorption process of the analytes from the fiber is thermally performed preventing fiber contact with mobile phase organic solvents; after analytes desorption they were collected in an organic solvent mixture, and then they were injected into the HPLC chromatograph with fluorescence detection. The advantage that presents this new off-line interface is that it protects the fiber from damage by contact with organic solvents, occurring in the on-line HPLC commercial interface. For developing the interface, five PAHs as "tests compounds" were chosen. Water samples of the Guadalix River and the Valdemayor reservoir were analyzed. The interface was validated by comparing the results with those obtained using the reference method EPA 550.1, with no significant at 95% probability differences.

The third part of the thesis approaches the problem of illegal discharges into water sources. A sampling device was developed for on-line SPME consisting of a stain steel mesh box within which four SPME fibres are allocated; the device is immersed in the river during a three days period, being possible to perform a dynamic sampling that allows the identification of possible industrial discharges into the river. In this study water of Manzanares and Jarama rivers were analyzed, allowing the detection and identification of very various organic compounds in the water of these rivers.

Finally, the potential interest of a marker in urine samples from pregnant women using the HS-SPME-GC-MS technique was evaluated. This marker allowed the determination of the fetus sex during the first trimester with likelihood of 94% using a sample of 36 pregnant women. The consolidation of this marker requires a more complete study, analyzing a number of urine samples statistically most representative.

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	7
1.1.1. Microextracción dinámica (SFME).....	8
1.1.1.1. Microextracción en aguja (in-needle).....	8
1.1.1.2. Microextracción en tubo (in-tube).....	10
1.1.2. Microextracción con agitación de la muestra (SSME).....	10
1.1.2.1. Extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE).....	11
1.1.2.2. Microextracción en membrana (TFME).....	12
1.1.2.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME) en fibra.....	15
1.1.2.3.1. Procedimiento general.....	19
1.1.2.3.2. Modos de extracción.....	21
1.1.2.3.2.1. Inmersión directa (DI).....	21
1.1.2.3.2.2. Espacio de cabeza (HS).....	22
1.1.2.3.2.3. Extracción con membrana protectora.....	23
1.1.2.3.2.4. Extracción <i>in vivo</i>	24
1.1.2.3.3. Fundamentos teóricos de la SPME.....	25
1.1.2.3.3.1. Aspectos Termodinámicos de la SPME.....	27
1.1.2.3.3.2. Aspectos Cinéticos de la SPME.....	33
1.1.2.3.4. Parámetros que afectan el proceso de extracción.....	36
1.1.2.3.4.1. Recubrimiento de la fibra.....	36

térmica para HPLC.....	64
1.3.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.....	66
1.3.4. Determinación del sexo fetal mediante SPME/GC/MS.....	68
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	71
2.1. Equipos.....	73
2.2. Dispositivos de Microextracción en Fase Sólida.....	76
2.3. Gases, disolventes y reactivos.....	77
2.4. Patrones.....	78
2.5. Preparación de disoluciones.....	79
2.6. Sistema Cromatográfico.....	81
2.6.1. Extracción dinámica HPLC/SPME.....	81
2.6.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.....	82
2.6.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.....	82
2.6.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME/CG/MS.....	83
2.7. Identificación de los analitos.....	84
2.7.1. Extracción dinámica HPLC/SPME.....	84
2.7.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.....	85
2.7.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.....	86
2.7.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME/CG/MS.....	86

TABLA DE CONTENIDO

2.8. Procedimiento SPME.....	86
2.8.1. Acondicionamiento de la fibra.....	86
2.8.2. Extracción dinámica HPLC / SPME.	88
2.8.2.1. Proceso de extracción dinámica.	88
2.8.2.2. Proceso de desorción.....	90
2.8.3. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.....	91
2.8.3.1. Proceso de extracción.....	91
2.8.3.2. Interfase de desorción térmica y recolección de analitos en disolventes orgánicos.	92
2.8.3.2.1. Descripción del sistema.....	92
2.8.3.2.2. Desorción térmica y recolección de los analitos en el disolvente.....	94
2.8.4. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.	95
2.8.4.1. Descripción del dispositivo de muestreo SPME on-line.....	95
2.8.4.2. Proceso de extracción.....	95
2.8.4.3. Proceso de desorción.	96
2.8.5. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME/CG/MS.	96
2.8.5.1. Proceso de extracción.....	96
2.9. Procedimiento Extracción en fase sólida (SPE).	97
2.10. Muestras.	100

2.10.1. Extracción dinámica HPLC/SPME.	100
2.10.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.....	101
2.10.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.	102
2.10.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME/CG/MS.....	104
2.11. Características analíticas de los métodos.	104
2.11.1. Linealidad.....	104
2.11.1.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.	105
2.11.1.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.....	105
2.11.2. Estudios de precisión.	105
2.11.3. Límites de detección y cuantificación.....	106
2.11.4. Estudios de Exactitud.....	106
2.11.5. Comparación del método propuesto con el método de referencia.....	107
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
3.1. Extracción dinámica HPLC/SPME.....	111
3.1.1. Optimización de los parámetros cromatográficos.	111
3.1.1.1. Gradiente de la fase móvil.....	111
3.1.1.2. Caudal de la fase móvil.....	111
3.1.1.3. Temperatura de la columna cromatográfica.	112

TABLA DE CONTENIDO

3.1.1.4. Detección de los PAHs.....	112
3.1.2. Proceso de extracción dinámica.....	114
3.1.3. Proceso de Desorción.....	116
3.1.4. Evaluación del método de SPME/HPLC.....	117
3.1.5. Análisis de muestras.....	122
3.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.....	124
3.2.1. Optimización de los parámetros cromatográficos.....	124
3.2.2. Proceso de extracción de microextracción en fase sólida.....	125
3.2.3. Desorción térmica y recolección de los analitos en el disolvente orgánico.....	127
3.2.3.1. Temperatura.....	128
3.2.3.2. Tiempo de desorción.....	128
3.2.3.3. Caudal de gas de arrastre argón.....	128
3.2.3.4. Forma y dimensiones del tubo colector.....	129
3.2.3.5. Naturaleza del disolvente orgánico colector.....	130
3.2.3.6. Volumen del disolvente colector.....	130
3.2.4. Evaluación SPME-HPLC Método Off-line.....	131
3.2.5. Análisis de muestras de agua.....	136
3.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.....	138
3.3.1. Optimización de los parámetros Cromatográficos con disolución patrón.....	138

3.3.2. Proceso de extracción.	139
3.3.3. Análisis de muestras de agua de río.	141
3.3.3.1. Rio Manzanares.....	141
3.3.3.2. Rio Jarama.	146
3.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME/CG/MS.....	151
3.4.1. Optimización de parámetros en HS-SPME.....	151
3.4.2. Análisis de muestras de orina.....	152
4. CONCLUSIONES.....	162
BIBLIOGRAFÍA.....	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Comparación con otras técnicas usuales de preparación de muestras: extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), y microextracción en fase sólida (SPME).....	7
Tabla 1-2. Comparación de las técnicas de preparación de muestras basadas en microextracción.....	14
Tabla 1-3. Criterio de selección del modo de extracción.....	21
Tabla 1-4. Tipos de fibra comercializadas para su uso en SPME.....	38
Tabla 1-5. Propiedades de los PAHs utilizados en la realización de este trabajo.....	61
Tabla 2-1. Resumen de los principales parámetros del método analítico.....	84
Tabla 2-2. Longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para cada PAH.....	85
Tabla 2-3. Condiciones de trabajo y acondicionamiento recomendadas por SUPELCO para las fibras de SPME.....	87
Tabla 2-4. Parámetros de configuración del CombiPAL.....	97
Tabla 3-1. Determinación de la linealidad para a) extracción dinámica SPME/HPLC; b) Método EPA 550.1.....	118
Tabla 3-2. Precisión y exactitud obtenidas con metodología de SPME extracción dinámica y método EPA 550.1.....	121
Tabla 3-3. Análisis de agua utilizando SPME con extracción dinámica y el método EPA 550.1.....	123
Tabla 3-4. Optimización de las variables de microextracción en fase sólida.....	126
Tabla 3-5. Parámetros optimizados en el proceso de desorción.....	127
Tabla 3-6. Determinación de la linealidad para a) método interfase SPME/HPLC; b) Método EPA 550.1.....	133
Tabla 3-7. Precisión y exactitud obtenidas con la metodología de SPME utilizando la interfase y método EPA 550.1.....	135
Tabla 3-8. Análisis de agua utilizando la nueva interfase y el método EPA 550.1.....	137

Tabla 3-9. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 85 μm CAR/PDMS Stableflex en el río Manzanares.....	143
Tabla 3-10. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 100 μm PDMS en el río Manzanares.	144
Tabla 3-11. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 7 μm PDMS en el río Manzanares.....	144
Tabla 3-12. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 85 μm PA en el río Manzanares.....	145
Tabla 3-13. Análisis de muestras de orina de mujeres en estado de gestación.....	160

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1.** Esquema de las diferentes técnicas de microextracción disponibles: (A) SPME en fibra; (B) extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE); (C) microextracción en película delgada (TFME); (D) extracción en fase sólida dinámica (SPDE); (E) microextracción en aguja empaquetada (PNME); (F) microextracción en cartucho con sorbentes empaquetados (MEPS); y (G) microextracción en tubo (In-tube)..... 13
- Figura 1-2.** Número de publicaciones científicas relacionadas con Microextracción en Fase Sólida desde 1990 hasta diciembre de 2015 (Fuente: Editorial Elsevier)..... 15
- Figura 1-3.** Mecanismos utilizados para SPME fabricados por Supelco,
a) Portafibras para cromatografía líquida con fibra.
b) Portafibras para cromatografía de Gases con fibra. **c)** Fibras 17
- Figura 1-4.** Esquema del dispositivo comercial de SPME..... 18
- Figura 1-5.** Proceso de extracción por espacio de cabeza (HS) o inmersión directa (DI) y proceso de desorción en Cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de alta eficacia.
(1) Se atraviesa el septum con la aguja de SPME,
(2) se despliega la fibra y se expone a la muestra en modo HS o DI, (3) se retrae la fibra y se lleva al instrumento de análisis. 20
- Figura 1-6.** Modos de extracción de SPME. (a) Modo de inmersión directa; (b) Modo de espacio de cabeza; (c) Modo de inmersión directa con membrana protectora. 23
- Figura 1-7.** Sistemas SPME *in vivo* para el muestreo de sangre en vasos sanguíneos. **(a)** Inserción directa de dispositivo de SPME en el vaso sanguíneo y **(b)** colocación de dispositivo de SPME y conexión de interfaz a la arteria carótida. 25

Figura 1-8. Clasificación de las fibras de SPME según predomine el mecanismo de absorción o adsorción.	37
Figura 1-9. Propiedades de las fibras de SPME disponibles en el mercado: Enlazada, No Enlazada, Parcialmente Entrelazada, Altamente Entrelazada.....	39
Figura 1-10. Efecto del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída; I. Control de tiempo crítico; un pequeño cambio en el tiempo introduce una gran diferencia de analito absorbido. II. El tiempo no es crítico; un pequeño cambio en el tiempo produce una pequeña o no cambia la cantidad de analito absorbido.	42
Figura 1-11. Tipos de derivatización en SPME.	50
Figura 1-12. Efecto del volumen del glass liner del inyector de un sistema GC en la desorción de la fibra.	52
Figura 1-13. Esquema de una interfase SPME-HPLC comercial con válvula Rheodyne.....	55
Figura 1-14. a) Esquema del Sistema SPME – CE, b) Interfase SPME-CE	57
Figura 1-15. Categorización metodológica de la microextracción en fase sólida acoplada a espectrometría de masas.	59
Figura 2-1. Sistema de acondicionamiento y limpieza de fibras de 2 puertos Nurka 390.....	76
Figura 2-2. Dispositivo de muestreo SPME on-line.....	77
Figura 2-3. Gradiente de la fase móvil utilizado para la separación de los PAHs.....	81
Figura 2-4. Gradiente de la fase móvil utilizado para la separación del naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno.	82
Figura 2-5 a) Interfase Supelco modificada para realizar extracción dinámica. 1. Holder SPME, 2. Interfase SPME/HPLC Supelco, 3. Mecanismo de vibración, 4. Jeringa con la muestra, 5. Bomba de infusión, 6. Inyector de 6 puertos HPLC. b) Ruta de flujo de la muestra en el inyector durante el proceso de extracción dinámica.	89
Figura 2-6. Esquema del procedimiento de microextracción y desorción utilizando la extracción dinámica con vibración en todo el proceso.....	90
Figura 2-7. Esquema del montaje para realizar el proceso de microextracción en fase sólida en agua, 1) Placa Agitadora; 2) Soporte Universal;	

TABLA DE CONTENIDO

3) Rotor; 4) Portafibras para fibra SPME; 5) muestra de PAHs.....	92
Figura 2-8. a) Vista de la interfase; b) Esquema de la interfase: 1) Entrada de gas argón, 2) Manómetro, 3) Termostato, 4) Glass liner, 5) Septum, 6) Holder, 7) Fibra SPME, 8) Boque metálico, 9) Tubo de acero, 10) Microtubo, 11) Baño de hielo.	93
Figura 2-9. Esquema del procedimiento de microextracción y desorción utilizado la nueva interfase.	94
Figura 2-10. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida utilizando el método EPA 550.1.	99
Figura 2-11. Puntos de toma de muestra a) Pantano de San Juan; b) Río Guadalix...	101
Figura 2-12. Sitio de toma de muestra en el Pantano de Valdemayor	102
Figura 2-13. Puntos de muestreo para a) Rio Manzanares; b) Rio Jarama.	103
Figura 3-1. Cromatograma de los PAHs con condiciones cromatográficas optimizadas para el punto medio de la curva de calibración.....	113
Figura 3-2. Optimización del volumen de extracción. a. PAHs de dos a cuatro anillos aromáticos: b. PAHs de cuatro a seis anillos aromáticos.	115
Figura 3-3. Optimización de velocidad de extracción dinámica a. PAHs de dos a cuatro anillos aromáticos: b. PAHs de cuatro a seis anillos aromáticos.	115
Figura 3-4. Comparación de áreas obtenidas con y sin aplicación de vibración a la cámara de desorción.....	116
Figura 3-5. Cromatograma de los PAHs en condiciones cromatográficas optimizadas. Naftaleno 84,6 µg/L; acenaftaleno 72,7 µg/L; fluoreno 40,0 µg/L; fenantreno 13,1 µg/L y antraceno 2,4 µg/L.	124
Figura 3-6. Variables que afectan el proceso de extracción SPME: a) Elección del recubrimiento de la fibra, b) Volumen de muestra, c) Tiempo, d) Agitación de la muestra. PAHs. d) Tipo de agitación.....	126
Figura 3-7. Variables que afectan el proceso de desorción: a) Temperatura, b) Tiempo de desorción, c) Flujo de argón (gas de arrastre).	129
Figura 3-8. Variables que afectan el proceso de recogida de los analitos: a) Elección la temperatura de desorción, b) Tiempo de desorción,	

c) Flujo gas de arrastre. d) Temperatura del disolvente colector, e) Volumen disolvente de arrastre.....	131
Figura 3-9. TIC obtenido mediante SPME de la mezcla de 54 VOC's.....	139
Figura 3-10. Montaje para la simulación de una descarga industrial en las aguas de un afluente. 1) Tanque de plástico que contiene 20 mL del estándar test en 5 L de agua de grifo, 2) bomba para el trasvase de la solución de los analitos, 3) agua de grifo, 4) tanque plástico de 40 L, 5) Dispositivo de muestreo SPME, 6) salida de agua.....	140
Figura 3-11. Cromatogramas de iones totales obtenidos en el río Manzanares para un muestreo de 3 días, a) fibra 85 µm CAR/PDMS Stableflex;	142
Figura 3-12. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 85 µm PA.	147
Figura 3-13. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 85 µm CAR/PDMS Stableflex.	148
Figura 3-14. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 100 µm PDMS.....	149
Figura 3-15. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 7 µm PDMS.....	150
Figura 3-16. Análisis de una muestra de orina de una mujer gestante de un feto de sexo masculino. a) Cromatograma TIC de la muestra de orina; b) Espectros de masas del compuesto que aparece a 33.856 min con un ion de m/z 180.1.....	155
Figura 3-17. Análisis de una muestra de orina de una mujer gestante de un feto de sexo femenino. a) Cromatograma iónico Total TIC de la muestra de orina; b) Espectros de masas del compuesto que aparece a 33.856 min con un ión de m/z 180.1.....	156
Figura 3-18. Estructura molecular de: a) trans 2-(-2-fenil-vinil) piridina; b) 9,10-dihidro-acridina.	157
Figura 3-19. Espectro de masas de: a) trans 2-(-2-fenil-vinil) piridina; b) 9,10-dihidro-acridina.	158

ABREVIATURAS

SPME	Microextracción en fase sólida.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
GC	Cromatografía de gases.
MS	Espectrometría de masas.
SFC	Flúidos Supercríticos.
TLC	Cromatografía de capa fina.
CE	Electroforesis capilar.
LLE	Extracción líquido-líquido.
SPE	Extracción en fase sólida.
SSME	Micro extracción con agitación de la muestra.
SFME	Microextracción con flujo de muestra.
SPDE	Extracción dinámica en fase sólida.
PNME	Microextracción en aguja empaquetada.
MEPS	Microextracción con sorbentes empaquetados.
TFME	Microextracción en membrana.
SBSE	extracción por sorción sobre barra agitadora.
HF	Fibra hueca.
HS	Espacio de cabeza.
DI	Inmersion directa.
PDMS	Polidimetilsiloxano.
PA	Poliacrilato.

DVB	Divinil benceno.
CAR	Carboxen.
CW	Cabowax.
BTEX	Benceno, toluene, xileno y etilbenceno.
PAHs	Hidrocarburos aromáticos polinucleares.
PAN	Poliacrilonitrilo.
PEG	Polietilenglicol.
PPY	Polipirrol.
EI	ionización electrónica.
ICP	Plama acoplado inductivamente.
LDI	Laser de desorción/ionización.
ACPI	Fuente ionización química a presión atmosférica.
ESI	Ionización por electroespray.
DESI	Desorción con ionización por electroespray.
EPA	Agencia de protección ambiental.
EU	Unión Europea.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
cff	Células fetales libres.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
NIST	Instituto Nacional de estándares y tecnología.
VOC's	Compuestos organicos volátiles.
PTFE	Politetrafluoroetileno.
RDS	Desviación estándar relativa.

LOD	Límite de detección.
LOQ	Límite de cuantificación.
ACN	Acetonitrilo.
MeOH	Metanol.
TIC	Cromatograma iónico total.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta tesis doctoral es introducir nuevos desarrollos analíticos en microextracción en fase sólida (SPME), en campos de aplicación como la contaminación ambiental y la medicina, aumentando el interés por esta metodología en los diferentes campos de estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Modificar la interfase comercial SPME-HPLC para mejorar la sensibilidad, lo que incluye una extracción dinámica con flujo continuo de la muestra sobre la fibra y la aplicación de la vibración en la interfase de desorción durante los pasos de extracción y desorción.
2. Desarrollar una interfase SPME/HPLC en línea evitando el contacto de la fibra de SPME con los disolventes orgánicos de la fase móvil al utilizar la interfase comercial para HPLC, lo que protege la fibra de su posible deterioro por contacto con dichos disolventes.
3. Desarrollar una herramienta que permita realizar un muestreo continuo en río, en su propio flujo, que permita evidenciar posibles puntos de vertidos industriales ilegales.

OBJETIVOS

4. Estudiar la utilidad de un marcador potencial detectado en la orina de las madres gestantes para la determinación precoz del sexo del bebé.

1. INTRODUCCIÓN

El análisis moderno de muestras complejas requiere que en las etapas del proceso de muestreo y de la preparación de la muestra se realice un trabajo analítico completo hasta la obtención de los resultados, para su posterior evaluación estadística y, por último, para tomar decisiones. Cada una de estas etapas es crítica para la obtención de resultados correctos; si una de estas etapas no se hace de manera adecuada, el rendimiento global del proceso sería insatisfactorio y en consecuencia, se puede esperar gran variabilidad en los datos. Por tal motivo, la elección de la metodología de muestreo y preparación de muestra en particular tiene el potencial de afectar la calidad de los resultados. La preparación de muestra, sin duda, puede ser citada como el paso más lento en el procedimiento analítico para las determinaciones cuantitativas en matrices complejas ya que alrededor del 60-80% del tiempo de trabajo y el coste operativo se emplea en esta etapa antes de su introducción en los instrumentos de medida [1]. Por consiguiente, una preparación óptima de la muestra es necesaria con el fin de minimizar el tiempo de preparación requerido, reducir el número de manipulaciones de matriz y etapas de preparación, ya que cada paso agrega su propia fuente potencial de error [2].

En el desarrollo de métodos se debe tener en cuenta dos factores. Primero, debido a que las muestras medioambientales son muy complejas, los métodos se basan mayoritariamente en el uso de técnicas de separación, básicamente cromatográficas, con las que se lleva a cabo la separación de los analitos; segundo, como las concentraciones a las que se encuentran presentes estos compuestos en las

INTRODUCCIÓN

muestras medioambientales son muy bajas, se precisan sistemas de detección muy sensibles para su cuantificación o bien se utiliza una etapa de preconcentración previa a la separación y detección. La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas de detección más utilizadas ya que permite identificar los compuestos al mismo tiempo que se cuantifican [3, 4]. Entre las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad se pueden mencionar principalmente la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) aunque existen otras técnicas cromatográficas de uso más minoritario como la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y la cromatografía de capa fina (TLC) [5, 6]. Entre las técnicas no cromatográficas que también se han aplicado al análisis medioambiental se puede mencionar la electroforesis capilar (CE) [7, 8].

Las técnicas más utilizadas de preparación de muestra se basan en las tecnologías tradicionales como la extracción Soxhlet [9, 10], líquido-líquido (LLE) [11, 12] que son laboriosas y consumen mucho tiempo; además, también requieren el uso de disolventes orgánicos potencialmente tóxicos [13] y la extracción en fase sólida (SPE) [14, 15]. LLE es un procedimiento de múltiples pasos que a menudo da lugar a la pérdida de analitos durante el proceso, por lo que con frecuencia la preparación de muestra es la principal fuente de errores en el análisis. Extracción en fase sólida (SPE) fue desarrollada en la década de los ochenta y se ha convertido en una poderosa herramienta para el aislamiento y purificación química debido a que precisa de menores cantidades de disolventes orgánicos, los tiempos necesarios para realizar la

extracción son menores y la manipulación de la muestra es también menor; esta técnica se limita a compuestos semivolátiles o no volátiles, con puntos de ebullición superiores a la temperatura del disolvente de desorción [16].

El principio en el que se basa la SPE, que es similar al de la cromatografía de líquidos, es la diferencia de afinidad de los analitos entre una fase sólida o líquida químicamente ligada a un soporte sólido, que es el sorbente y una líquida, que es la muestra. Existen diferentes tipos de sorbentes que se comercializan en forma de cartuchos o discos y que se escogen en función de los analitos que se quieren determinar. Se pueden diferenciar básicamente tres tipos, los sorbentes de sílices enlazadas [17], los de carbón [18, 19] y los poliméricos [20, 21]. Otros tipos de sorbentes para SPE, que se han desarrollado más recientemente son los inmunosorbentes y los polímeros de huella molecular [14, 22]. La elución de los analitos retenidos se realiza mediante unos pocos mililitros de un disolvente orgánico como por ejemplo metanol, diclorometano o acetato de etilo. Aunque, SPE puede ser acoplada en línea con la GC y HPLC [23, 24, 25], este método aún requiere múltiples pasos y presenta inconvenientes tales como pérdidas en la etapa de evaporación, riesgos de contaminación y pérdida de sensibilidad debido a la inyección de sólo una pequeña alícuota de la muestra [26].

Es evidente que la demanda de determinaciones más rápidas y más precisas que incluyan la presencia de un número cada vez mayor de analitos orgánicos a

INTRODUCCIÓN

concentraciones de niveles de trazas en muestras ambientales, biológicas y alimentarias complejas, han influido en gran parte de los avances en la preparación de la muestra. En los últimos años los avances en el campo del análisis medioambiental se han dirigido al desarrollo de nuevas técnicas de preconcentración que sean de fácil uso, que permitan minimizar la manipulación de la muestra, que no precisen del uso de disolventes orgánicos, que puedan ser fácilmente automatizadas y que sean rápidas. Otro aspecto importante a tener en cuenta es que estas nuevas técnicas de preconcentración permitan realizar análisis de campo. Como resultado de ello, las limitaciones de la SPE se superaron mediante la colocación de una cantidad muy pequeña de la fase de extracción en una barra de sílice fundida.

El uso de una pequeña cantidad de fase líquida en las técnicas de microextracción proporciona un mayor rendimiento de preconcentración desde grandes volúmenes [27]. La pequeña geometría de este dispositivo permite la transferencia de masa rápido durante la extracción y desorción y evita el taponamiento que sucede con los cartuchos de SPE. La idea de un dispositivo de este tipo ha permitido el desarrollo de una nueva técnica de preparación de la muestra: Microextracción en Fase Sólida (SPME) [28]. La Microextracción en Fase Sólida destaca por su sencillez, ausencia de disolventes orgánicos, sensibilidad elevada y bajo coste. El proceso de SPME consta de dos pasos: partición de analitos entre el recubrimiento y la matriz de la muestra, seguido de desorción del extracto concentrado en el instrumento analítico. En la Tabla 1-1 se muestran los principales

pasos del proceso de preparación de la muestra con diferentes técnicas usuales en los laboratorios [29].

Tabla 1-1. Comparación con otras técnicas usuales de preparación de muestras: extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), y microextracción en fase sólida (SPME).

<i>LLE</i>	<i>SPE</i>	<i>SPME</i>
Adición de disolventes orgánicos a la muestra.	Acondicionamiento de cartuchos o membranas.	Exposición de la fibra de SPME a la muestra.
Agitación en un embudo de decantación.	Elución de la muestra.	Desorción de analitos en el instrumento analítico.
Separación de las fases acuosa y orgánica	Elución del disolvente para eliminar interferencias y desorción de los analitos.	
Eliminación de la fase acuosa.	Evaporación / concentración de la fase orgánica	
Evaporación / concentración de la fase orgánica.	Medida en el instrumento analítico	
Medida en el instrumento analítico		

1.1. TÉCNICAS BASADAS EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Desde que se introdujo la SPME en fibra en la década de 1990, la miniaturización en la preparación de muestras se ha convertido en una tendencia dominante en la química analítica [30, 31], ya que presenta numerosas ventajas frente a la preparación de muestra tradicional. Algunas de ellas son: simplicidad, rapidez,

economía, minimización de las etapas y de la manipulación de la muestra, mayor precisión y sensibilidad. Además, se minimiza la cantidad de muestra, el consumo de reactivos y de disolventes costosos y tóxicos, más compatibles con la química verde. Esto ha llevado al surgimiento de una variedad de técnicas asociadas a la microextracción. Existen dos clasificaciones para estas técnicas basadas en SPME: la primera, las que se realizan con agitación de muestra durante la extracción, denominada estática (sample-stir microextraction (SSME)) y otra dinámica en la que la muestra hace pasar, con un flujo determinado, por el medio sorbente (sample-flow microextraction (SFME)) [32].

1.1.1. Microextracción dinámica (SFME).

SFME se realiza mediante una jeringa o bomba que pasa la muestra a través de los revestimientos o sorbentes, en esta se incluye la microextracción en aguja (in-needle) y en tubo capilar (in-tube). [32].

1.1.1.1. Microextracción en aguja (in-needle)

La microextracción en aguja (In-needle), ha evolucionado en varios tipos, el primero que se desarrolló utiliza una jeringa provista de una aguja con un revestimiento interior como dispositivo de extracción (Figura. 1-1 D), conocida como extracción dinámica en fase sólida (SPDE). El volumen del revestimiento en la pared

interior de la aguja es inferior a 0.5 μL aproximadamente; el principal inconveniente de SPDE es que tiende a contaminar el revestimiento, debido a que los analitos tienden a permanecer en la pared interior de la aguja después de la desorción térmica [32].

Otro tipo de microextracción In-needle es denominado Microextracción en aguja empaquetada (packed-needle microextraction, PNME), en el cual los sorbentes o fibras se empaquetan en el interior de una aguja extraíble montada en una jeringa (Figura 1-1 E). La muestra se hace pasar a través de la aguja por succión mediante una jeringa o bomba; la capacidad de extracción se puede variar mediante el aumento de sorbente y/o el volumen de la muestra [36, 37].

La última de las metodologías que involucra la microextracción In-needle se basa en un cartucho empaquetado con material sorbente (Microextraction by packed sorbent, MEPS), figura 1-1 F. Esta técnica puede ser vista como extracción en fase sólida miniaturizada y se aplica un procedimiento similar al SPDE. La muestra se succiona y expulsa a través de una jeringa varias veces hasta alcanzar un equilibrio. Posteriormente, los analitos extraídos se eluyen con un pequeño volumen de disolventes (10-50 μL) directamente en el inyector de GC o LC. Una ventaja importante de MEPS es que puede manejar volúmenes pequeños de muestra (10 μL), así como los volúmenes grandes (1000 μL) [39, 40], por lo que es una técnica muy prometedora para su aplicación a muestras biológicas y ambientales. Una limitación

de MEPS, es que para la extracción in-situ el sorbente debe estar acondicionado con paso de disolvente antes de la extracción.

1.1.1.2. Microextracción en tubo (in-tube)

Otro desarrollo de la SFME, es la microextracción In-Tube, la cual utiliza una columna capilar de sílice fundida tubular abierta como un dispositivo de extracción. Los compuestos orgánicos en muestras acuosas se extraen directamente y se concentran en la fase estacionaria de la columna capilar haciendo pasar la muestra varias veces a través de un capilar, los analitos extraídos se pueden transferir directamente a la columna de cromatografía de líquidos (Figura 1-1 G) [41, 42, 43].

1.1.2. Microextracción con agitación de la muestra (SSME).

En la SSME se incluyen la microextracción en fibra (SPME), en película delgada (thin-film microextraction (TFME)) y en barra magnética de agitación (stir-bar sorptive extraction (SBSE)). En estos métodos la microextracción se lleva a cabo con agitación constante de la muestra.

1.1.2.1. Extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE).

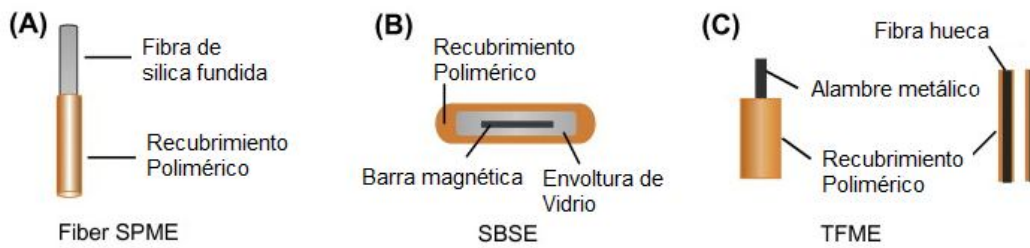
La extracción SBSE, utiliza una barra de agitación magnética recubierta con una capa delgada de material sorbente. La barra magnética puede agitar la muestra líquida para la extracción (inmersión) o ser colocada en la fase gaseosa por encima de la muestra (espacio de cabeza). Segudamente, los analitos se desorben ya sea térmicamente o con un disolvente líquido para el análisis por GC y LC (principalmente), respectivamente. Generalmente, se requiere una interfaz especial (unidad de desorción) para la desorción térmica [33].

Una diferencia principal entre la SPME en fibra y SBSE es la cantidad de fase de extracción. Típicamente, el volumen de la fase de extracción en SBSE (hasta ~125 μL) es 50-250 veces mayor que la de la fibra de SPME. Esto conlleva un mayor factor de enriquecimiento, lo que hace que la técnica SBSE sea adecuada para el análisis de trazas. Sin embargo, el mayor volumen de la fase de extracción introduce algunos problemas; el tiempo de extracción de SBSE es mayor que en SPME en fibra porque se requiere más tiempo para alcanzar el equilibrio. Por otra parte, el tiempo de desorción es más largo (típicamente 10 min), por lo que es necesario concentrar los analitos durante la transferencia usando una trampa fría ($-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la temperatura ambiente de acuerdo con la volatilidad de los analitos) [34]. Una de las desventajas más importante de SBSE frente a las fibras de SPME es que sólo tiene un tipo de sorbente, que es el PDMS.

1.1.2.2. Microextracción en membrana (TFME).

TFME utiliza una membrana que lleva la fase de extractante, tiene mayor eficacia de extracción, debido al mayor volumen de sorbente y su relación más alta de superficie a volumen. Al igual que en SBSE, para la desorción térmica de los analitos adsorbidos en la película necesita la asistencia de una interfase. En un reciente desarrollo de TFME para la extracción in situ se ha implementado un sistema que utiliza una fibra hueca (hollow-fiber (HF)), las superficies interiores y exteriores de la HF están recubiertas por una capa delgada (1.2 a 1.3 micras) de polímero que presenta una fuerte afinidad hacia los compuestos clorados y bromados. La membrana recubierta se puede colocar directamente en un vial que contiene la muestra para la extracción [35].

Microextracción con Agitación de la Muestra



Microextracción In-needle (con flujo de muestra)

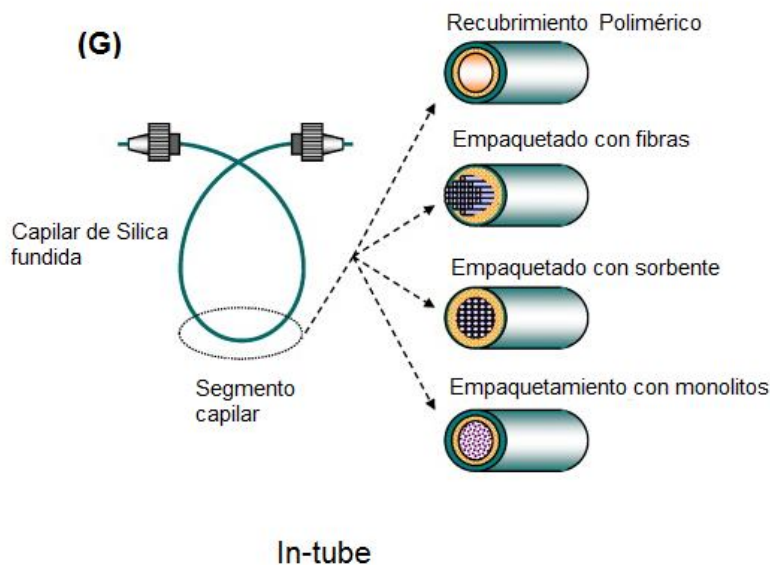
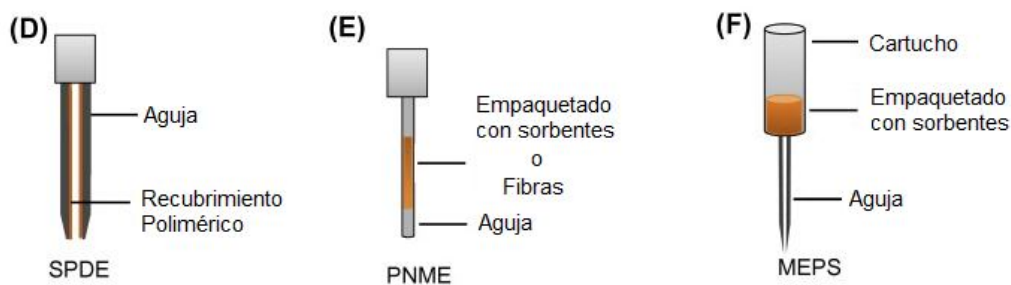


Figura 1-1. Esquema de las diferentes técnicas de microextracción disponibles: (A) SPME en fibra; (B) extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE); (C) microextracción en película delgada (TFME); (D) extracción en fase sólida dinámica (SPDE); (E) microextracción en aguja empaquetada (PNME); (F) microextracción en cartucho con sorbentes empaquetados (MEPS); y (G) microextracción en tubo (In-tube).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1-2. Comparación de las técnicas de preparación de muestras basadas en microextracción.

Consideraciones típicas	SPME	SBSE	SPDE	MEPS	PNME
Volumen de la muestra (mL)	0,5-20	1-100	0,01-0,1	0,01-0,1	1-100
Matriz de la muestra*	G, L, S	G, L, S	G, L, S	L	G, L
Tiempo de extracción aproximado (min)	10-90	30-200	2-10	2-10	<1.30
Factor de enriquecimiento	Alto	Alto	Alto	Moderado	Moderado
Polaridad adecuada de analitos	NP-SP	NP-SP	NP	NP-P	NP-P
Disponible comercialmente	Si	Si	Si	Si	No
Robustez de la técnica	Moderado	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno
Coste del dispositivo	Moderado	Moderado	Bajo	Bajo	Bajo
Accesorio	Agitador	Agitador	Se acciona Manualmente o con bomba	Se acciona Manualment e o con bomba	Se acciona Manualment e o con bomba
Automatización	Alto	Moderado	Alto	Alto	Alto
Observaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad. • Fibras frágiles. • tiempo de vida de las fibras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad. • Revestimientos limitados. • Necesita unidad de desorción. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad. • Revestimientos limitados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo mayor de disolventes durante la elusión. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta rapidez del método.
Fuentes de error	Pérdida de recubrimiento durante la desorción	Pérdida de recubrimiento durante la desorción	Pérdida de recubrimiento durante la desorción.	Pérdidas de analistas durante la desorción.	Pérdidas de analistas durante la desorción.

* G, Gas; L, Líquido; S, sólido; NP, no polar; SP, semi-polar; P, Polar.

1.1.2.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME) en fibra.

Esta técnica fue introducida por Pawliszyn y colaboradores a comienzos de 1990 [44]; en la actualidad, se ha convertido en una técnica rutinaria en muchos laboratorios siendo constante el aumento de publicaciones (Figura 1-2). En un principio, SPME fue introducida para analizar compuestos relativamente volátiles en el campo del medio ambiente; actualmente, su uso se ha extendido a muy diversas áreas de análisis dado que representa un valioso avance en uno de los pasos fundamentales como lo es la preparación de muestras en una gran variedad de matrices: gaseosas, líquidas, sólidas y biológicas [45, 46, 47, 48, 49, 50] , y para una amplia gama de analitos volátiles a partir de compuestos no volátiles [51, 52, 53, 54].

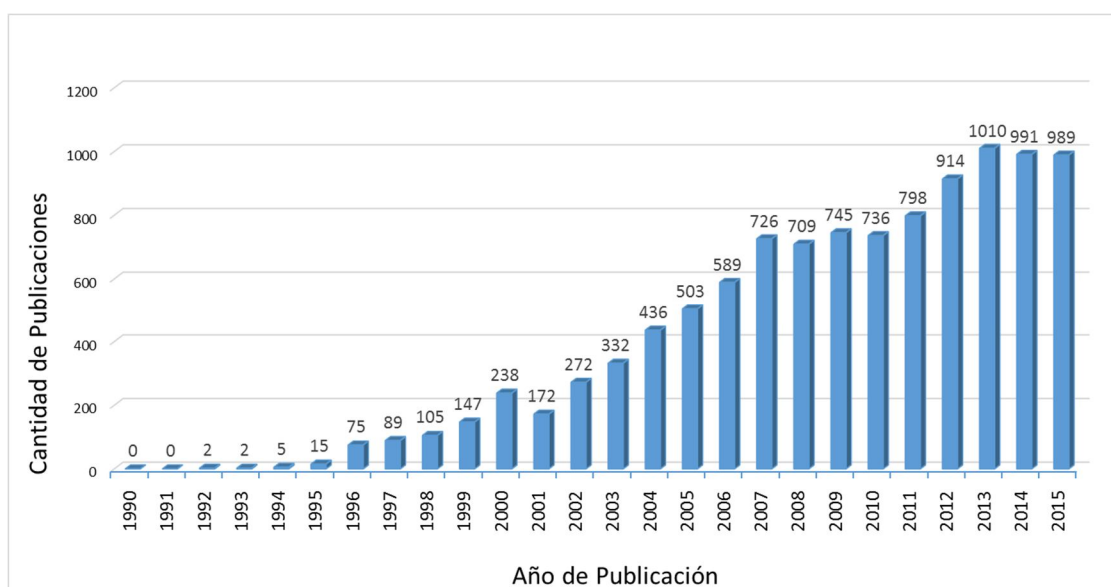


Figura 1-2. Número de publicaciones científicas relacionadas con Microextracción en Fase Sólida desde 1990 hasta diciembre de 2015 (Fuente: Editorial Elsevier).

INTRODUCCIÓN

En SPME los analitos se extraen de la muestra en una fase sorbente sólido o líquido. Se integra el muestreo, la extracción y el enriquecimiento en un solo paso libre de disolvente mediante una fibra de sílice fundida recubierta de un material sorbente, en la mayoría de los casos un recubrimiento polimérico, seguida de la desorción de los analitos térmicamente o mediante el empleo de un disolvente orgánico y se introducen en dispositivos de separación o de detección para el análisis. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en el interior de una aguja de una jeringa, de tal forma que esta puede retraerse y desplegarse de su interior quedando expuesta así a la muestra. De esta manera, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja. La casa comercial Supelco comercializó diferentes configuraciones para el acoplamiento de la fibra a la jeringa, en la figura 1-3a y 1-3b se muestra un esquema del dispositivo comercial de SPME.

El portafibras consiste en un cuerpo de acero inoxidable, un embolo, un medidor ajustable con una aguja guía y una tuerca de acero inoxidable como se muestra en la figura 1-4. Además, el dispositivo está diseñado para ser usado con una fibra reemplazable, cada fibra puede ser usada entre 20 y 150 análisis o más, dependiendo de la matriz y del cuidado en el manejo durante su uso [55, 56].



Figura 1-3. Mecanismos utilizados para SPME fabricados por Supelco, **a)** Portafibras para cromatografía líquida con fibra. **b)** Portafibras para cromatografía de Gases con fibra. **c)** Fibras.

Cada fibra de SPME está ensamblada en el interior de una aguja de acero inoxidable, lo que le permite atravesar el septum del cromatógrafo de gases y ser introducida directamente en el inyector para la desorción de los analitos. La fibra también está provista de una férula de latón, un septum de cierre y un muelle de tensión [57]. El color del tornillo de enlace de la fibra indica el tipo de fase que contiene la fibra, (figura 1-3c).

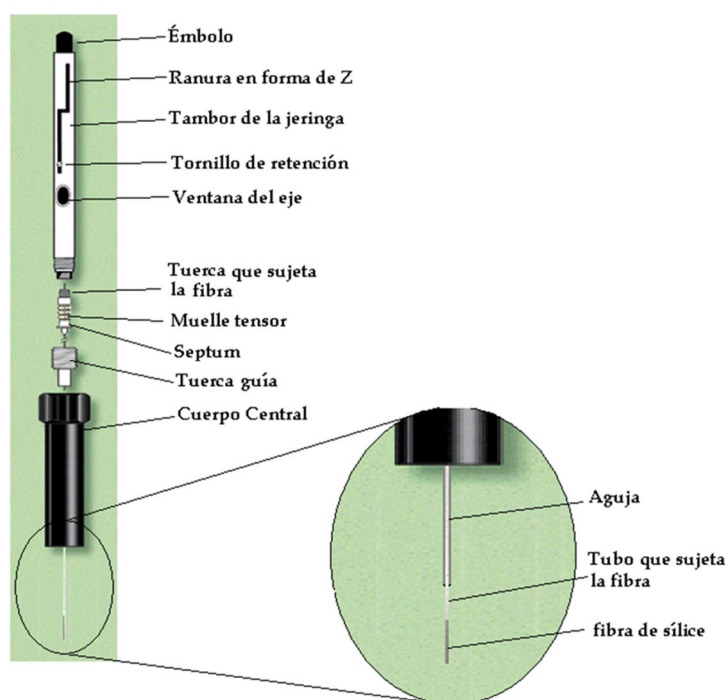


Figura 1-4. Esquema del dispositivo comercial de SPME.

La SPME presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas de preconcentración; es una técnica muy simple lo que lo hace de fácil uso, minimiza el consumo de disolvente orgánico, los tiempos de preparación de muestra mínimos, requiere pequeños volúmenes de muestra, es fácilmente automatizable, presenta un bajo coste y la capacidad de producir resultados analíticos cualitativos y cuantitativos en muestras complejas. Además, debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo [58, 59]. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire [60, 61] o aliento [62, 63], líquidas como aguas o bebidas [64, 65], o sólidas como sedimentos, alimentos, etc.

[66, 67] o biológicas [68, 69]; un reciente avance en aplicaciones biomédicas de SPME incluyen el desarrollo de *in vivo* SPME [70, 71, 72, 73].

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinados, de manera que se produce una migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, en una segunda etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra.

1.1.2.3.1. Procedimiento general.

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas: en la primera la fibra se introduce a través del septum de un vial donde se encuentra la muestra y la fibra se pone en contacto con los analitos o su espacio de cabeza durante un tiempo y temperatura determinados, de manera que se produce una migración de los mismos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza el equilibrio. En una segunda etapa, después de un tiempo determinado, la fibra es retirada del vial e inmediatamente se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra en el instrumento analítico para su análisis. En La figura 1-5 se muestra el procedimiento general de SPME.

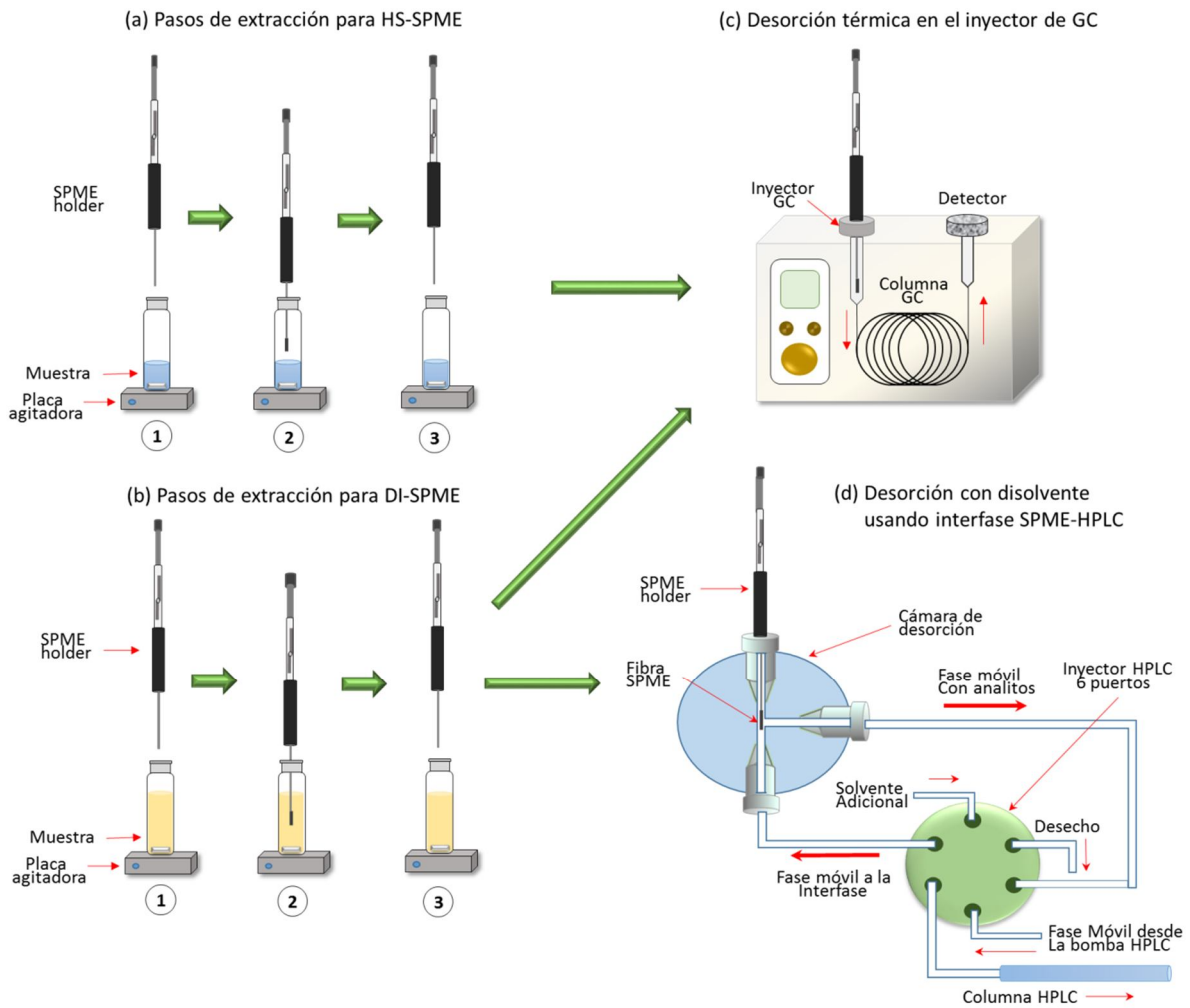


Figura 1-5. Proceso de extracción por espacio de cabeza (HS) o inmersión directa (DI) y proceso de desorción en Cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de alta eficacia. (1) Se atraviesa el septum con la aguja de SPME, (2) se despliega la fibra y se expone a la muestra en modo HS o DI, (3) se retrae la fibra y se lleva al instrumento de análisis.

1.1.2.3.2. Modos de extracción

La extracción mediante SPME puede llevarse a cabo de tres maneras distintas: inmersión directa, extracción en espacio de cabeza y extracción con membrana protectora; la figura 1-6 ilustra estos modos de extracción SPME. La elección del modo de extracción se realiza considerando tres aspectos importantes: la matriz de la muestra, la volatilidad del analito y su afinidad por la fibra sorbente como se indica genéricamente en la tabla 1-3.

Tabla 1-3. Criterio de selección del modo de extracción.

Modo SPME	Propiedades del analito	Matrices
Inmersión Directa	De media a baja volatilidad	Muestras gaseosas, líquidas.
Espacio de Cabeza	De alta a mediana volatilidad	Muestras líquidas, sólidas
Membrana Protectora	Baja volatilidad	Muestras complejas
In-vivo	De mediana a baja volatilidad	Muestras biológicas

1.1.2.3.2.1. Inmersión directa (DI).

La fibra de SPME es introducida directamente en la muestra y los analitos son transportados desde la matriz de la muestra a la fase extractante (figura 1-6a). Para

acelerar el proceso de extracción, se requiere la agitación de la muestra para facilitar la difusión de los analitos desde la muestra a los alrededores de la fibra.

1.1.2.3.2.2. Espacio de cabeza (HS).

La fibra se introduce en el espacio de cabeza de la muestra; los analitos necesitan ser transportados a través del aire antes de ser sorbidos por la fibra (figura 1-6b). Esta variación a la inmersión directa ayuda a evitar el deterioro de las fibras por contacto directo con interferentes de elevado peso molecular y otras sustancias no volátiles presentes en la muestra, tales como materiales húmicos o proteínas; también permite una modificación en el pH en la muestra, sin dañar la fibra. En el modo espacio de cabeza, los analitos son extraídos en la fase vapor en equilibrio con la muestra; por tanto, es una extracción indirecta desde la matriz. Por este motivo, los analitos más volátiles son extraídos más rápidamente que los semivolátiles. La temperatura tiene un efecto significativo en la cinética del proceso, puesto que determina la presión de vapor de los analitos. En general, los tiempos de equilibrio para compuestos volátiles son más cortos en el modo de extracción por espacio de cabeza que por inmersión directa bajo condiciones de agitación similares, debido a que una importante fracción de los analitos está presente en la fase vapor antes del comienzo del proceso de extracción y además los coeficientes de difusión en la fase gaseosa son más altos que en la fase líquida. La extracción en espacio de cabeza es

muy útil para el análisis de muestras sólidas como sedimentos o alimentos [1, 74] o muestras biológicas [75, 76] donde la interferencia de la matriz es importante.

1.1.2.3.2.3. Extracción con membrana protectora.

La extracción con membrana protectora es similar a la de inmersión directa, pero en ésta se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra que evita que compuestos de elevado peso molecular, como ácidos húmicos o proteínas, que pueden estar presentes en la matriz de la muestra lleguen hasta la fibra y puedan deteriorarla (figura 1-6c); el proceso de extracción es más lento que en inmersión directa, debido a que los analitos necesitan difundirse a través de la membrana antes de alcanzar el recubrimiento de la fibra [1, 42].

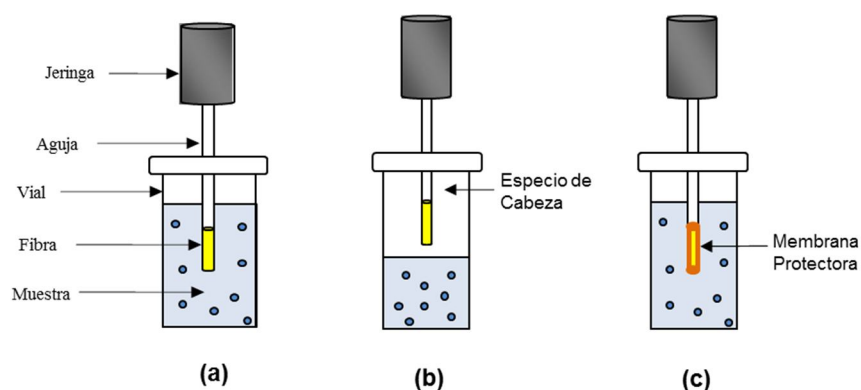


Figura 1-6. Modos de extracción de SPME. (a) Modo de inmersión directa; (b) Modo de espacio de cabeza; (c) Modo de inmersión directa con membrana protectora.

1.1.2.3.2.4. Extracción *in vivo*.

La extracción *in vivo* se basa en la inmersión directa del recubrimiento de la fibra en un sistema vivo con el fin de extraer el analito directamente sobre el revestimiento sin tener que tomar una muestra representativa de biofluido o tejido del sistema vivo. Por lo tanto, esta técnica elimina la necesidad, por ejemplo, de extraer la sangre durante los estudios fármaco-cinéticos y permite el estudio directo de varios procesos bioquímicos *in vivo*. Sin embargo, este modo de extracción es mucho más exigente que el muestreo convencional. Los dispositivos de SPME deben ser biocompatibles y esterilizables, preferentemente mediante autoclave, para evitar reacciones adversas y/o tóxicas en el sistema vivo, tales como la coagulación o el rechazo inmunológico y para prevenir la adhesión de moléculas biológicas, tales como proteínas [77, 78, 79, 80]. El diseño de los dispositivos de exposición directa *in vivo* debe incorporar un soporte mecánicamente fuerte, flexible y una fibra irrompible, por lo que para estos análisis la fibra de SPME no es de sílice fundida sino metálica. Los procedimientos de muestreo más complejos en sistemas *in vivo* incluyen la inserción de la fibra de SPME directamente en el sistema en estudio, bien en vena, en un animal, en la muestra de sangre que fluye (figura 1-7a) o en un tejido, tal como el músculo. El muestreo de pequeños roedores requiere una interfase debido al pequeño tamaño de los vasos sanguíneos, lo que impide la inserción directa de sondas de SPME (figura 1-7b) [81].

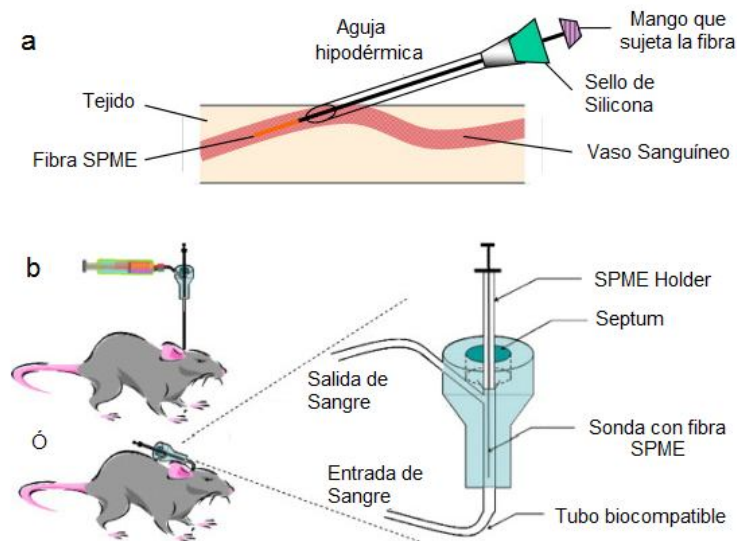


Figura 1-7. Sistemas SPME *in vivo* para el muestreo de sangre en vasos sanguíneos. **(a)** Inserción directa de dispositivo de SPME en el vaso sanguíneo y **(b)** colocación de dispositivo de SPME y conexión de interfaz a la arteria carótida.

1.1.2.3.3. Fundamentos teóricos de SPME

En SPME existen diferentes mecanismos de concentración de los analitos sobre la fibra, condicionado por los diferentes tipos de recubrimientos disponibles comercialmente. Desde un punto de vista físico los recubrimientos pueden ser líquidos o sólidos.

En el caso de los recubrimientos líquidos el valor de los coeficientes de difusión es suficiente para dar lugar a la partición entre las 2 fases (fibra y muestra), es decir, tiene lugar la absorción. En este proceso no hay competencias por sitios

activos, sino que las moléculas de los analitos se disuelven en el polímero líquido, de ahí que el rango dinámico de trabajo sea más amplio.

Cuando se trata de un recubrimiento sólido los analitos permanecen en la superficie del mismo, dando lugar a la adsorción como mecanismo de extracción. La adsorción es un proceso competitivo, por lo que las moléculas con gran afinidad por la superficie del recubrimiento pueden reemplazar a aquellas con menor afinidad, lo que provoca que la composición de la matriz ejerza un efecto importante sobre la cantidad de analito extraída.

La microextracción en fase sólida implica fundamentos de transferencia de masa y termodinámicos. El transporte de los analitos desde la muestra al recubrimiento polimérico comienza tras poner la fibra en contacto con ella. El proceso de extracción se considera completo cuando se ha alcanzado el equilibrio entre la concentración de analito en la muestra y en el material polimérico. Así, la cantidad de analito extraída puede calcularse desde un punto de vista termodinámico, mientras que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede estimarse resolviendo ecuaciones diferenciales de la teoría de transporte de masas.

En los últimos años muchos autores han desarrollado modelos teóricos que permitiesen entender todos aquellos fenómenos relacionados con la SPME. Así, Louch y colaboradores [82] formularon una teoría sobre la termodinámica de la

extracción vía absorción en un sistema de dos fases en equilibrio, muestra y fibra; mientras que Zhang y Pawliszyn [83] la hicieron extensible a un sistema de tres fases: fibra, espacio de cabeza y muestra. Posteriormente, Ai [84, 85, 86] realizó una descripción teórica sobre el proceso de absorción en condiciones de no-equilibrio, mientras que Górecki y colaboradores [87] propusieron una teoría acerca de la extracción vía adsorción en el equilibrio.

1.1.2.3.3.1. Aspectos Termodinámicos de la SPME.

Como se mencionó anteriormente, la microextracción en fase sólida es un proceso basado en la concentración de equilibrio del analito en la muestra y las etapas de extracción. Tras la introducción de la fibra en la muestra, los analitos comienzan a migrar hacia el medio de extracción. Se considera como final del proceso, el tiempo a partir del cual el analito alcanza la concentración de equilibrio en las fases, después de este tiempo, la cantidad de analito retenido permanece constante en el tiempo. En un análisis en particular se debe optimizar el tiempo necesario para que el sistema alcance el equilibrio [88].

SPME implica el equilibrio directo del analito en dos fases distintas, mientras que en espacio de cabeza entran en juego tres fases, la muestra líquida (o gaseosa), la fase de vapor por encima de la muestra de líquido (espacio de cabeza) y la fase de extracción (polimérica líquida o adsorbente sólido) [42]. Idealmente, la matriz debe

INTRODUCCIÓN

ser homogénea y los analitos estables en las fases implicadas. El tratamiento termodinámico descrito a continuación se refiere al proceso de partición, característico de los recubrimientos de fibra con película de líquido polimérico. El tratamiento para los recubrimientos sólidos es análogo cuando se trabaja con concentraciones bajas de analito, ya que el área superficial disponible para la adsorción será proporcional al volumen del recubrimiento, asumiendo que la porosidad del adsorbente es constante [1, 89].

Durante la extracción los analitos se distribuyen entre las 3 fases hasta alcanzar el equilibrio. Por tanto, la cantidad de analito extraída por el recubrimiento polimérico está relacionado con las concentraciones individuales del mismo presentes en cada fase. Haciendo un balance de masa, se tiene:

$$C_0V_A = C_F^\infty V_F + C_H^\infty V_H + C_A^\infty V_A \quad \text{Ecuación 1-1}$$

Donde, C_0 es la concentración total del analito en la muestra original; C_F^∞ , C_H^∞ y C_A^∞ son las concentraciones del analito en la fibra, en el espacio de cabeza y en la muestra, al alcanzarse el equilibrio; y V_F , V_H y V_A son los volúmenes del recubrimiento de la fibra, del espacio de cabeza y de la muestra, respectivamente.

Las constantes de distribución del analito entre el recubrimiento polimérico y el espacio de cabeza, K_{FH} , entre el espacio de cabeza y la muestra, K_{HA} , y entre el recubrimiento polimérico y la muestra, K_{FA} , se definen como:

$$K_{FH} = \frac{C_F^\infty}{C_H^\infty} \quad \text{Ecuación 1-2}$$

$$K_{HA} = \frac{C_H^\infty}{C_A^\infty} \quad \text{Ecuación 1-3}$$

$$K_{FA} = \frac{C_F^\infty}{C_A^\infty} = K_{FH}K_{HA} \quad \text{Ecuación 1-4}$$

En estas expresiones se supone que los analitos se encuentran a niveles trazas en la muestra y que ésta es pura, por ello se utilizan concentraciones en lugar de actividades. Teniendo en cuenta las ecuaciones anteriores, se puede calcular que la masa de analito concentrado por la fibra,

$$n = C_F^\infty V_F, \quad \text{Ecuación 1-5}$$

vendría dado por:

$$n = \frac{K_{FH}K_{HA}V_FV_A}{K_{FH}K_{HA}V_F + K_{HA}V_H + V_A} C_0 \quad \text{Ecuación 1-6}$$

INTRODUCCIÓN

Como la constante de distribución del analito en las fases fibra/muestra, K_{FA} , es igual al producto $K_{FH}K_{HA}$, se tiene:

$$n = \frac{K_{FA}V_FV_A}{K_{FA}V_F + K_{HA}V_H + V_A} C_0 \quad \text{Ecuación 1-7}$$

La ecuación 1-7 establece para condiciones de equilibrio que la cantidad de analito extraída es independiente de la localización de la fibra en el sistema. La fibra se puede situar en el espacio de cabeza o directamente en la muestra, siempre y cuando los volúmenes y las condiciones en las que se lleve a cabo la extracción (temperatura, tiempo, agitación, ...) se mantengan constantes.

Considerando la extracción de la muestra en modo directo (el vial está completamente lleno, no hay espacio de cabeza), la porción $K_{HA}V_H$ puede ser despreciada. De este modo, la ecuación 1-7 toma la forma:

$$n = \frac{K_{FA}V_FV_A}{K_{FA}V_F + V_A} C_0 \quad \text{Ecuación 1-8}$$

Como los valores de K_{FA} generalmente son muy pequeños, junto con el hecho de que, normalmente, el volumen de muestra, V_A , es mucho mayor que el volumen del recubrimiento de la fibra, V_F , se puede suponer que $K_{FA}V_F \ll V_A$. Por lo tanto:

$$n = K_{FA}V_F C_0 \quad \text{Ecuación 1-9}$$

Podemos ver una correlación lineal entre la cantidad de analito extraído de la muestra y la concentración inicial de la matriz, es decir:

$$n = K C_0 \quad \text{Ecuación 1-10}$$

En modo de espacio de cabeza, partiendo de la ecuación (1-7), se puede considerar que las fases muestra/espacio de cabeza tienen el mismo volumen ($V_A = V_H$).

$$n = \frac{K_{FA} V_F V_A}{K_{FA} V_F + (1 + K_{HA}) V_A} C_0 \quad \text{Ecuación 1-11}$$

Utilizando el mismo razonamiento empleado para el modo directo, tenemos $K_{FA} V_F \ll (1 + K_{HA}) V_A$, entonces :

$$n = \frac{K_{FA} V_F}{(1 + K_{HA})} C_0 \quad \text{Ecuación 1-12}$$

Se concluye que la cantidad de analito recogido por la fibra en el espacio de cabeza también sigue una dependencia lineal de la concentración inicial del analito en la muestra:

$$n = k' C_0 \quad \text{Ecuación 1-13}$$

Por otra parte, si se generaliza para un sistema de n fases, la ecuación 7, se transforma en:

$$n = \frac{K_{FA}V_F C_0 V_A}{K_{FA}V_F + \sum_{i=1}^{i=n} K_{iA}V_i + V_A} \quad \text{Ecuación 1-14}$$

Donde K_{iA} es la constante de distribución del analito entre la i -ésima fase y la muestra de interés, y V_i es el volumen de la fase i -ésima.

A partir de la ecuación 1-14, se puede concluir, que en el equilibrio, la cantidad de analito extraída por la fibra será menor cuanto mayor sea el número de fases presentes en el vial de microextracción [89, 90].

Hay que destacar que las ecuaciones anteriores son válidas únicamente cuando el recubrimiento polimérico es líquido. En el caso de recubrimientos sólidos en los cuales la extracción de los analitos se realiza mediante un proceso de adsorción, el modelo matemático que explica el proceso de extracción es ligeramente diferente al utilizado para fibras con recubrimiento líquido [87]. La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

$$n = \frac{K_{FA}V_F C_0 V_A (C_{f \max} - C_f)}{K_{FA}V_F + V_A (C_{f \max} - C_f)} \quad \text{Ecuación 1-15}$$

donde K_{FA} es la constante de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra

y $C_{f\ max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que los que aparecen en la ecuación 1-8.

1.1.2.3.3.2. Aspectos Cinéticos de la SPME.

La cinética del proceso de extracción está determinada por la velocidad de transferencia de masa desde la muestra a la fibra. El tiempo requerido para el equilibrio (t_e), en modo de inmersión directa, sólo depende del espesor de la película de líquido de la fibra (L_F) y del coeficiente de difusión del analito en la fibra extractiva, (D_F) :

$$t_e = \frac{L_F^2}{2D_F} \quad \text{Ecuación 1-16}$$

Al aumentar el espesor del recubrimiento, aumenta la cantidad de analito retenida por la fibra, lo que conduce a tiempos de extracción más altos. Por otra parte, otros parámetros deben ser cuidadosamente evaluados como temperatura de extracción y agitación de la muestra con el fin de facilitar la difusión del analito en la fibra hasta alcanzar el equilibrio [1].

De acuerdo con la ecuación 1-16, el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio sería infinito, pero debido a las incertidumbres experimentales inherentes a extracciones SPME, se considera, como se muestra en la Ecuación 1-17, un tiempo

de equilibrio práctico, t_{95} , que corresponde a la extracción de 95 % de la masa que se toma después de un tiempo infinito de la extracción.

$$t_e \approx t_{95} = \frac{L_F^2}{2D_F} \quad \text{Ecuación 1-17}$$

En el modo de espacio de cabeza sin agitar la muestra, la transferencia de masa implica un sistema de tres fases, de espacio de cabeza, fibra y matriz que depende del equilibrio de reparto entre las tres fases, las dimensiones de las capas y el coeficiente de difusión del soluto en las mismas. La correlación entre estos factores y el equilibrio con el tiempo, válido para extracciones sin agitación se describe por la ecuación 1-18:

$$t_e \approx t_{95} = 1.8 \left(\frac{L_H}{K_{HA}D_H} + \frac{L_A}{1.6D_A} \right) K_{FA}L_F \quad \text{Ecuación 1-18}$$

Donde L_H , L_A y L_F son los espesores del espacio de cabeza, de la muestra y del recubrimiento líquido de la fibra, respectivamente; D_H y D_A son los coeficientes de difusión del analito en el espacio de cabeza y en la muestra; K_{HA} y K_{FA} son las constantes de distribución del analito en las fases espacio de cabeza/muestra y fibra/muestra, respectivamente.

Un análisis de la ecuación 1-17 indica que al disminuir el espesor de las fases, disminuye el tiempo de equilibrio, aunque tales reducciones se limitan a ciertos aspectos como las disminuciones en el espesor de la película de líquido (L_F) y en la capacidad de la fibra para extraer los analitos (las películas más delgadas retienen una cantidad menor de analitos lo que puede comprometer el análisis de matrices a nivel de trazas). Además, reducciones significativas en el espesor de la muestra (L_A), pueden afectar la sensibilidad del método, y cuando se combina con la reducción en el espesor del espacio de cabeza (L_H), también pueden tener efectos indeseables sobre la termodinámica del proceso, especialmente cuando la concentración de los analitos difieren lo suficiente de las de las fases de la muestra y del espacio de cabeza [89].

Un aumento en los coeficientes de difusión D_H y D_A , también disminuye el tiempo de extracción. Esto se puede lograr con una agitación eficiente de la muestra y/o calentamiento de la misma. En cuanto a las constantes de distribución K_{HA} y K_{FA} , el tiempo de extracción es optimizado para analitos con pequeñas constantes de distribución entre las fases de fibra/muestra (K_{FA}) y con grandes constantes de distribución entre las fases de espacio de cabeza/muestra (K_{HA}) [89].

Finalmente, es importante señalar que se puede trabajar en condiciones de no equilibrio, especialmente en los casos en que el tiempo de extracción es demasiado largo. Sin embargo, las condiciones de extracción deben ser extremadamente

controladas para asegurar la exactitud del método, tales como el grado de agitación y la temperatura de la muestra. En tales casos, una buena reproducibilidad de los tiempos de extracción es fundamental en cada muestra, ya que las variaciones de esta comprometen las determinaciones. Los sistemas automatizados son más adecuadas en estas situaciones [91].

1.1.2.3.4. Parámetros que afectan el proceso de extracción.

La cantidad de analito extraído por la fibra en SPME puede verse afectada por diversos parámetros, por ejemplo, las características del recubrimiento, la temperatura, el tiempo de extracción, la adición de sal o un disolvente orgánico a la muestra, modificación del pH, agitación del la muestra y del volumen de la misma. Efectos de la matriz y la introducción de un paso de derivatización también puede afectar la extracción de analitos en SPME.

1.1.2.3.4.1. Recubrimiento de la fibra.

La elección de un recubrimiento adecuado para la fibra de SPME depende de la estructura química de la muestra. Como regla general en la selección del recubrimiento de la fibra se puede aplicar "semejante disuelve a semejante". Actualmente, se dispone comercialmente de varios recubrimientos y su selectividad se basa en la polaridad y la volatilidad de las moléculas. Los recubrimientos más usuales hasta la fecha son las fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) con películas de

diferentes espesores (7, 30 y 100 micras); también están disponibles fibras de poliacrilato (PA) de 85 micras, las fases mixtas de PDMS-divinilbenceno (DVB) de 65 y 60 micras, Carboxen (CAR) -PDMS de 75 micras y Carbowax (CW) -DVB de 65 micras. En la tabla 1-4 se muestran las fibras comercializadas por Supelco.

La fibra PDMS es una fase no polar que extrae analitos polares después de optimizar las condiciones de extracción, tales como pH, concentración de sal, y temperatura [16, 91, 92, 93]. La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción [74, 94] aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunos analitos (sobre todo si son muy apolares) puede implicar un mecanismo de adsorción ya que parece existir una cierta competitividad entre ambos efectos [95, 96]. En la figura 1-8 se clasifican las fibras según el proceso de extracción por absorción o adsorción.

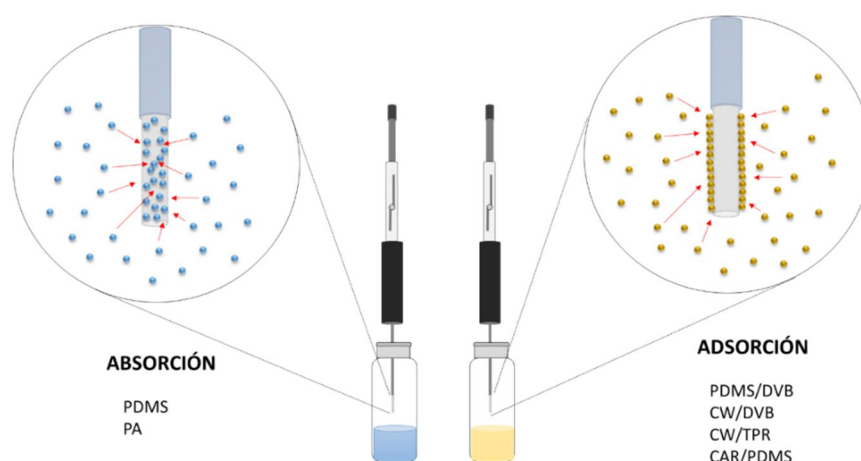


Figura 1-8. Clasificación de las fibras de SPME según predomine el mecanismo de absorción o adsorción.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1-4. Tipos de fibra comercializadas para su uso en SPME.

Fase estacionaria / espesor	T máxima de uso	Polaridad	Uso recomendado
<i>Polidimetilsiloxano (PDMS)</i>			
100µm, fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
30 µm, fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
7 µm, fase enlazada	340 °C	No polar	GC/HPLC
<i>Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)</i>			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	GC
60 µm, fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	HPLC
65 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
<i>Poliacrilato (PA)</i>			
85 µm, fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
<i>Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)</i>			
75 µm, fase parcialmente entrecruzada 85 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	320 °C	Bipolar	GC GC
<i>Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB)</i>			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
70 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	265 °C	Polar	GC
<i>Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)</i>			
50 µm, fase parcialmente entrecruzada	240 °C	Polar	HPLC
<i>Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)</i>			
50/30 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
50/30 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹) ²	270 °C	Bipolar	GC

¹ Fibras *Stableflex*: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible.

² Longitud especial de 2 cm.

Las fibras de poliacrilato (PA), son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean retenidos por la fibra de forma similar a las fibras de PDMS [16, 97]. Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS por lo que en general los tiempos de extracción son mayores para los compuestos volátiles en el espacio de cabeza [98]. Las fibras en las que se combina más de un polímero, como por ejemplo las de PDMS/DVB o CW/DVB, son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, ya que son polímeros sólidos [1, 97]. En general, en este tipo de fibras, las constantes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las fibras de PDMS. El principal inconveniente es el intervalo lineal dinámico, que es menor que en las fibras de absorción [55].

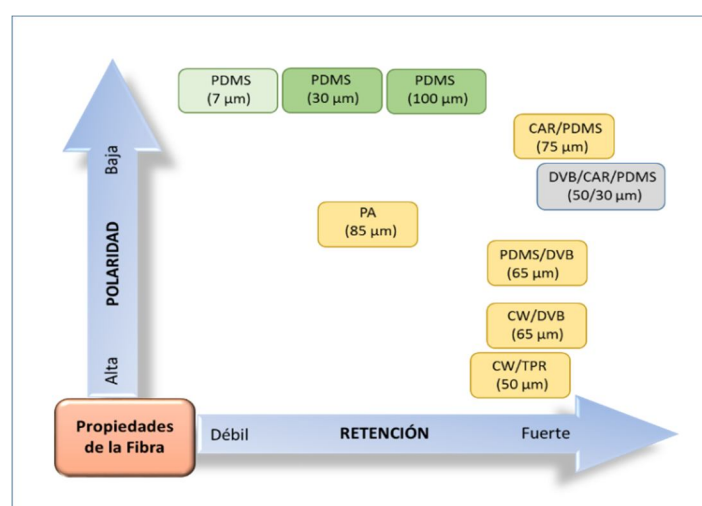


Figura 1-9. Propiedades de las fibras de SPME disponibles en el mercado: ■ Enlazada, ■ No Enlazada, ■ Parcialmente Entrelazada, ■ Altamente Entrelazada.

Aparte de los absorbentes disponibles comercialmente, la mayoría de las tendencias recientes en SPME se han centrado en el desarrollo de nuevas fases de extracción y/o mejoras de las fases de extracción existentes con el fin de abordar factores de biocompatibilidad, limitaciones de compatibilidad, selectividad y sensibilidad de los recubrimientos y formatos disponibles en la actualidad [99]. Algunos autores han introducido recubrimientos de fibras muy selectivos para un determinado compuesto y para aplicaciones más específicas, como por ejemplo los de carbón [100], C8 [101], C18 [102], polipirrol [103] o incluso fibras recubiertas con polímeros de huella molecular (MIPs) [99, 104]. También se han desarrollado recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o compuestos inorgánicos que son difícilmente extraídos con las fibras comerciales [104]. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para analitos polares como fenoles y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs) o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno) [1,105].

Para dispositivos *in-vivo*, un requisito fundamental de las fibras SPME es la biocompatibilidad del revestimiento: (i) para evitar reacciones adversas y/o tóxicas en el sistema vivo, tales como la coagulación, (ii) para prevenir que se adhieran moléculas biológicas, tales como proteínas, a la superficie del recubrimiento porque tal adsorción puede afectar a la cinética de absorción de analito y en gran medida la cantidad de analito extraído por SPME. Además de la biocompatibilidad, resistencia

mecánica y buena eficiencia de extracción, un revestimiento ideal para el uso en SPME *in-vivo* también debe tener una buena reproducibilidad inter-fibra, que permita el uso de una sola fibra y tiempos de extracción muy cortos. Por lo tanto, el éxito del muestreo *in-vivo* está directamente relacionado con la disponibilidad de los recubrimientos que cumplen con todos estos requisitos. En la última década, se han desarrollado varios materiales biocompatibles incluyendo polímeros tales como PDMS, poliacrilonitrilo (PAN), polietilenglicol (PEG) y polipirrol (PPY) [72].

1.1.2.3.4.2. Tiempo de extracción.

Al desarrollar un método analítico basado en SPME se debe optimizar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, que es característico de cada par analito-fibra. El tiempo de equilibrio es aquél a partir del cual la cantidad de analito retenida se mantiene constante [1]. Parámetros como la agitación favorecen la difusión de los analitos normalmente para lograr el equilibrio más rápido debido a que mejora la difusión de los analitos hacia la fibra. Los compuestos con bajos coeficientes de difusión tienen largos tiempos de equilibrio; en este caso, para disminuir el tiempo de análisis, se construye una curva de perfil de tiempo de extracción, y se observa la dependencia de la cantidad de analito extraída como una función del tiempo (figura 1-10). El tiempo más corto aceptable se elige de acuerdo con el límite de detección del analito. En estos casos es muy importante controlar estrictamente el tiempo de extracción ya que pequeñas oscilaciones en la medida del

tiempo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída, afectando la reproducibilidad del método [1, 98].

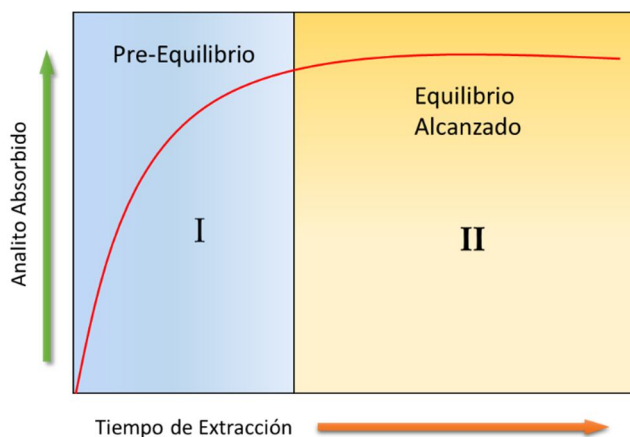


Figura 1-10. Efecto del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída; **I.** Control de tiempo crítico; un pequeño cambio en el tiempo introduce una gran diferencia de analito absorbido. **II.** El tiempo no es crítico; un pequeño cambio en el tiempo produce una pequeña o no cambia la cantidad de analito absorbido [55].

Todos aquellos parámetros como la agitación, que favorezcan la difusión de los analitos, contribuyen a reducir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. En la práctica se puede trabajar con tiempos de extracción menores, sin llegar a alcanzar el equilibrio, siempre y cuando se controle de manera precisa los parámetros que afecten a la cinética del proceso para obtener suficiente reproducibilidad en los resultados [42, 98].

1.1.2.3.4.3. Temperatura de extracción.

La temperatura de extracción es crítica para la cuantificación, debido a que afecta tanto a la cinética como a la termodinámica del proceso de retención. Se debe aplicar siempre una temperatura constante, en todas las extracciones, para obtener buena precisión, sensibilidad y selectividad en el proceso [106].

El equilibrio entre el analito retenido en el revestimiento de fibra de SPME y la concentración en la solución de la muestra depende de la solubilidad del analito en la fase acuosa y su afinidad por la fase de la fibra de SPME. El aumento de la temperatura aumenta la presión de vapor parcial de analitos en el espacio de cabeza, pero al mismo tiempo disminuye la constante de la distribución en el espacio de cabeza [106]; la temperatura alta facilita el desprendimiento de los analitos de la muestra, mejorando así la sensibilidad y acortando el tiempo de extracción debido al aumento de la concentración de los analitos en el espacio de cabeza por lo que aumenta la cantidad de analito retenida en la fibra y la extracción es también más rápida. La temperatura de extracción tiene dos efectos opuestos sobre la técnica de SPME. Primero, el aumento de temperatura provoca el aumento de los coeficientes de difusión y de las constantes de Henry, acelerando la cinética de extracción, lo que aumenta la cantidad de analito extraído; sin embargo, en condiciones de equilibrio el proceso de extracción es exotérmico, por lo que el aumento de la temperatura reduce la constante de la distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la

eficacia de la extracción se ve afectada negativamente provocando una disminución de la sensibilidad cuando se utilizan tiempos de muestreo próximos al equilibrio, tal efecto se observa en la ecuación 1-19 [107, 108] :

$$K_{FA} = K_0 e^{\frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad \text{Ecuación 1-19}$$

Donde K_{FS} es la constante de distribución del analito entre la muestra y la fibra; K_0 es la constante de distribución cuando la muestra y la fibra están a T_0 ; ΔH es el cambio de la entalpía de analito cuando se desplaza el analito a la fibra; R es la constante de los gases.

En general, en la optimización del método debe usarse la temperatura más alta que provoque una sensibilidad satisfactoria y no alargue el análisis.

1.1.2.3.4.4. Volumen de la muestra.

El volumen de muestra utilizado para la microextracción está directamente relacionado con la sensibilidad del método, esto es con el número de moles de analito extraídos de la muestra por la fibra n , que viene determinada por la ecuación 1-11; como se deduce de esta ecuación, a medida que el volumen de muestra V_A aumenta, también incrementa la cantidad de analito extraída, hasta que es lo suficientemente alto como para que la suma $K_{FA}V_F + (1 + K_{HA})V_A$ sea mucho más pequeña que V_A ; en

este caso n no depende del volumen. En consecuencia, el uso de volúmenes de muestra no afectará la sensibilidad del método [89, 90].

1.1.2.3.4.5. Volumen del espacio de cabeza.

En HS-SPME, los analitos se distribuyen entre la muestra, la fibra y el espacio de cabeza. Los compuestos muy volátiles se concentran en el espacio de cabeza, dando lugar a una disminución en la eficacia de la extracción cuando su volumen es muy grande [1, 42]. Teóricamente, el volumen de espacio de cabeza también afecta a la cinética del proceso. Cuanto más pequeño sea éste, con relación al volumen de muestra, más rápido será el transporte de los analitos desde la muestra a la fibra [39, 90]. En la práctica, los coeficientes de difusión de los analitos en muestras líquidas son muy inferiores a los correspondientes a muestras gaseosas, por lo que el volumen de muestra ejerce una influencia más acusada en la cinética de la microextracción que el volumen del espacio de cabeza [90].

1.1.2.3.4.6. Geometría del vial.

La forma del vial que contiene la muestra también afecta a la cinética del proceso de SPME, especialmente en aquellas situaciones en las que la etapa limitante es la transferencia de masa entre la muestra y el espacio de cabeza. En este caso, cuanto más estrecho es el vial menor va a ser la superficie de contacto entre muestra

y espacio de cabeza y por lo tanto, más lenta será la cinética de extracción. Además, la forma del vial influye en los movimientos de convección que puedan existir entre la fase gaseosa (espacio de cabeza) y la fase condensada (muestra) cuando se agita la muestra. Por otro lado, los viales altos pueden dificultar la agitación eficaz de la muestra [28, 109, 110].

1.1.2.3.4.7. Agitación de la muestra.

La agitación mecánica de la muestra es importante para reducir el tiempo de equilibrio, mejora la exactitud y precisión, debido al incremento de la difusión de los analitos, siendo un aspecto crítico cuando se analizan compuestos semivolátiles por muestreo de inmersión.

La técnica de agitación más utilizada es la agitación magnética, la cual requiere la introducción de una barra de agitación en el vial. Otras técnicas alternativas deben tenerse en cuenta, sobre todo con fines de automatización; la técnica de la vibración de la aguja utiliza un motor externo en el diseño de un nuevo inyector automático (limitada a un volumen pequeño de muestra); la vibración de la fibra se puede aplicar por separado; la agitación vortex, la cual mueve rápidamente el vial en un movimiento circular. Uno de los métodos de agitación más eficaz para SPME es el de ultrasonidos, el cual proporciona tiempos de extracción cortos. Sin

embargo, presenta el inconveniente de calentar la muestra y en algunos casos la destrucción de analitos [29, 42, 90].

1.1.2.3.4.8. Adición de sal.

La presencia de una sal inorgánica como KCl, NaCl o Na₂SO₄ en muestras acuosas aumenta la constante de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada por efecto "salting out"; como resultado se favorece la cantidad de analito extraída en la fibra [1, 55]. Además, el efecto salino mejora los coeficientes de actividad de los componentes volátiles en soluciones acuosas, lo que aumenta la concentración del analito en el vapor del espacio de cabeza. Sin embargo, con especies iónicas, se observa una disminución de la eficacia de la extracción ya que aumenta el coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la disolución [110].

1.1.2.3.4.9. Ajuste del pH.

El ajuste del pH de la muestra puede mejorar la sensibilidad del método para analitos básicos y ácidos, razón por la cual es un factor importante a tener en cuenta en la optimización del proceso. En SPME, la extracción es más eficaz cuando los compuestos se encuentran sin disociar, es decir, en su forma neutra [90, 111]. Si los analitos son ácidos para que estén presentes en la forma neutra, se trabaja a valores

de pH al menos dos unidades por debajo del pKa o dos unidades por encima para analitos básicos, lo que asegura que los analitos estén en su forma molecular. Además, el pH debe estar comprendido en el rango recomendado para cada tipo de fibra [90].

1.1.2.3.4.10. Adición de disolventes orgánicos.

La adición de un disolvente orgánico a muestras acuosas, modifica la constante de distribución, K_{FA} , y normalmente, disminuye considerablemente la eficacia del proceso de extracción ya que aumenta la solubilidad de los analitos apolares en la muestra. Sin embargo, la adición de disolvente orgánico en muestras sólidas y lodos mejora la difusión de analitos de la muestra hacia el recubrimiento de la fibra [29, 90, 112].

1.1.2.3.4.11. Composición de la Matriz.

La matriz tiene una influencia importante en la eficiencia de la extracción, debido a que la materia orgánica disuelta en ella compite con los analitos orgánicos en la absorción en la fase polimérica de la fibra. La presencia de materia particulada en suspensión u otro tipo de sustancias de carácter orgánico, como ácidos húmicos, fúlvicos, aceites, ralentiza la cinética de extracción, debido principalmente a las interacciones de los analitos con la materia orgánica. Además, ciertas sustancias

húmicas pueden retenerse en la fibra irreversiblemente, dañando la fase polimérica de la misma [28, 113].

1.1.2.3.5. Derivatización en SPME.

La derivación puede ser utilizada si los compuestos a extraer son muy polares. En consecuencia, se hace necesaria la utilización de un agente derivatizante para favorecer la extracción y/o la determinación de dichos analitos. En SPME el proceso de derivatización se puede realizar de tres maneras: *i)* derivatización directa en la matriz de la muestra, *ii)* dopaje del recubrimiento de la fibra con el reactivo derivatizante, *iii)* derivatización en el puerto de inyección de GC [29]. Cuando el proceso de derivatización se realiza antes o durante la extracción puede incrementar la afinidad de los analitos por la fibra, así como la selectividad de la preparación de muestra, mientras que si se realiza después de la microextracción, tiene como objetivo único mejorar la calidad de las separaciones cromatográficas.

- i) Derivatización directa en la matriz de la muestra :* en esta técnica el agente derivatizante se adiciona directamente al vial que contiene la muestra, produciéndose la reacción de derivatización. Los derivados formados se extraen con la fibra de SPME y son introducidos en el equipo de medida [35, 36, 37].

ii) *Dopaje del recubrimiento de la fibra con el reactivo derivatizante sobre la fibra de SPME :*

Existen dos posibilidades para su realización. La primera de ellas consiste en dopar el recubrimiento de la fibra con el agente derivatizante antes de la extracción, [38, 39]. En este caso, el derivatizante tiene que poseer una gran afinidad por el recubrimiento de la fibra y una baja presión de vapor, con el fin de asegurar su permanencia en la fibra durante la etapa de concentración[26]. Otra posibilidad, es relizar primero la retención de los analitos en la fibra y seguidamente se derivatizan en la misma, tras exposición al espacio de cabeza de un vial que contiene el agente derivatizante [40, 41, 42].

iii) *Derivatización en el puerto de inyección de GC :* este proceso tiene lugar cuando los analitos y el reactivo derivatizante presentes en la fibra se someten a altas temperaturas en el inyector del cromatógrafo de gases. Por tanto, los compuestos son desorbidos y derivatizados simultáneamente [42].



Figura 1-11. Tipos de derivatización en SPME.

1.1.2.3.6. Proceso de desorción.

Una vez retenido el analito en la fibra, éste se desorbe para su análisis mediante GC o de HPLC. Cuando la SPME se acopla a la GC, la desorción se realiza térmicamente; si para el análisis se emplea HPLC, la desorción se realiza mediante disolución de los analitos en un disolvente orgánico adecuado, utilizando generalmente una interfase especial.

Aunque la combinación de SPME con GC es la que más se utiliza, también se han publicado diversos trabajos en los que la SPME se usa combinada con HPLC y de una forma más puntual con la electroforesis capilar y directamente con MS.

1.1.2.3.6.1. SPME / Cromatografía de Gases (GC).

La desorción térmica de los analitos se lleva a cabo en el inyector de un cromatógrafo de gases; para que ésta sea eficiente se debe de tener en cuenta la volatilidad del analito, y optimizar la temperatura del inyector, tiempo de exposición durante la desorción y la temperatura inicial del horno. Otros parámetros que también afectan la desorción son el espesor del recubrimiento de la fibra y la profundidad de la fibra en el inyector. Se recomienda utilizar la temperatura máxima de trabajo de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no haya efecto

memoria. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos [1, 114]. Otros aspectos, han de tenerse en cuenta; el uso de un glass liner de inyección adecuado; los inyectores cromatográficos estándar, tales como el típico *split/spitless*, requieren glass liners de grandes volúmenes para ajustar la expansión del disolvente introducido en el inyector. El objetivo de estos glass liners es de producir flujos lineales lentos para una lenta transferencia de los analitos volatilizados a la cabeza de la columna analítica (figura 1-12). En estos casos, el *split* abierto permite eliminar los restos del disolvente. Sin embargo, en SPME no se introduce ningún disolvente con lo cual el *split* no sería necesario. Para una óptima sensibilidad, el *split* necesita estar cerrado durante la etapa de desorción con lo cual los analitos son eliminados rápidamente del inyector, consiguiendo así picos estrechos. Por consiguiente y para conseguir un flujo lineal elevado, es aconsejable reducir el diámetro del glass liner del inyector. El tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y la velocidad de flujo lineal alrededor de la fibra [1].

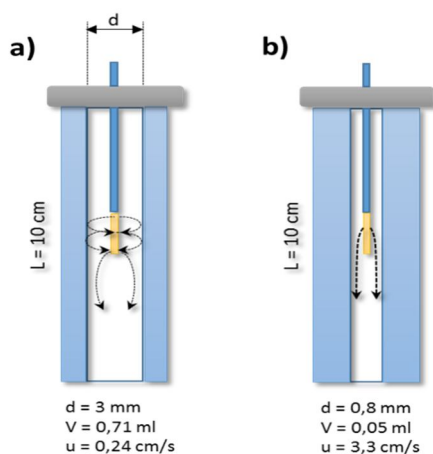


Figura 1-12. Efecto del volumen del glass liner del inyector de un sistema GC en la desorción de la fibra.

Cuando se lleva a cabo la desorción en el inyector del GC, al aumentar la temperatura, disminuye la constante de distribución de los compuestos en la fibra y los analitos son arrastrados hasta la columna analítica mediante el flujo del gas portador. En la ecuación 1-20 se muestra la disminución lineal de las constantes de distribución al aumentar la temperatura:

$$\log K_{FA} = a\left(\frac{1}{T}\right) + b \quad \text{Ecuación 1-20}$$

Donde, K_{FA} es la constante de distribución entre los analitos y la fibra, a y b son dos constantes y T es la temperatura. Los puertos de inyección de cromatografía de gases, generalmente inyectores *split/splitless*, son adecuados para llevar a cabo la desorción térmica de los analitos de la fibra [1].

1.1.2.3.6.2. SPME / Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

La desorción térmica es el modo más sencillo de desorber los analitos de la fibra; sin embargo, los compuestos térmicamente inestables o poco volátiles y no se pueden determinar directamente mediante GC. En estos casos la combinación de la SPME con HPLC es más adecuada siendo necesario utilizar un disolvente orgánico para la desorción de los analitos; ésta se puede llevar a cabo en línea (on-line) o bien fuera de línea (off-line) con el sistema cromatográfico [114, 115].

INTRODUCCIÓN

La desorción fuera de línea respecto al sistema cromatográfico se realiza introduciendo la fibra con los analitos retenidos en un vial que contenga una pequeña cantidad de disolvente orgánico, que sea compatible con el recubrimiento de la fibra y con la técnica analítica HPLC posterior, de manera que se produzca la desorción de los analitos; a continuación, una alícuota de este disolvente es inyectada en el cromatógrafo de líquidos donde se realiza la separación y cuantificación de los mismos [93, 116].

Cuando se realiza la desorción en línea con HPLC, se utiliza una interfase que permita realizar la desorción de los analitos ya sea por disolución en la propia fase móvil del cromatógrafo de líquidos o bien por disolución en un disolvente orgánico adecuado en la cámara de desorción de la interfase [117, 118].

Actualmente se dispone de una interfase comercializada por Supelco para llevar a cabo la desorción en HPLC pero en algunos trabajos la interfase utilizada es de fabricación propia [118, 119]; en la Figura 1-13 se muestra el diseño de esta interfase comercial para SPME-HPLC.

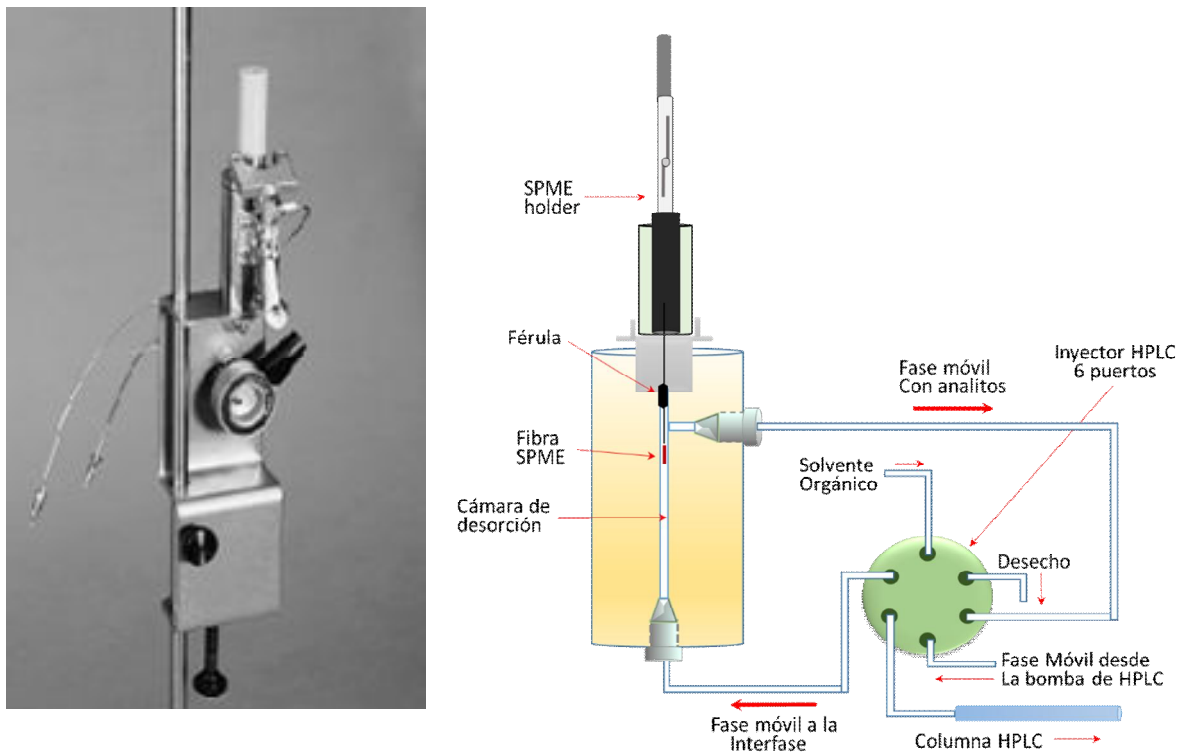


Figura 1-13. Esquema de una interfase SPME-HPLC comercial con válvula Rheodyne .

Cuando la desorción se realiza en línea utilizando una interfase para SPME-HPLC, ésta se puede realizar de dos maneras que son denominadas desorción dinámica y estática. En la desorción dinámica, la fibra se introduce en la cámara de desorción e inmediatamente se cambia la posición de la válvula de forma que la fase móvil pasa a través de la cámara de desorción y los analitos son desorbidos al mismo tiempo que son arrastrados hacia la columna analítica. Este modo de desorción en ocasiones puede provocar un ensanchamiento de los picos ya que el poder de disolución de la fase móvil puede no ser suficiente para proporcionar una rápida desorción de los mismos [1, 55].

La desorción en modo estático puede evitar el problema de ensanchamiento de los picos observado en la desorción en modo dinámico. Este modo de desorción consiste en la introducción de la fibra de SPME en la cámara de desorción de la interfase durante un tiempo determinado en presencia de la misma fase móvil o bien de un disolvente orgánico adecuado, que puede ser introducido en la cámara de desorción con una jeringa, de manera que se produzca la desorción de los analitos. El tiempo de permanencia de la fibra en la cámara de desorción es un parámetro que se debe optimizar. Finalizado este tiempo, se gira la válvula de manera que la fase móvil pasa a través de la cámara de desorción y arrastra los analitos hacia la columna analítica [55].

1.1.2.3.6.3. SPME / Electroforesis Capilar (CE).

Debido a las buenas características que presenta la SPME como técnica de pre-concentración, además de combinarse con técnicas cromatográficas de uso más habitual, como GC y HPLC, también se ha realizado el acoplamiento tanto fuera de línea como en línea de SPME con CE. Al igual que en SPME-HPLC, la diferencia fundamental que presenta el acoplamiento SPME-CE con la SPME-GC es la etapa de desorción, en la figura 1-14 se muestra un esquema de dicho acoplamiento [120].

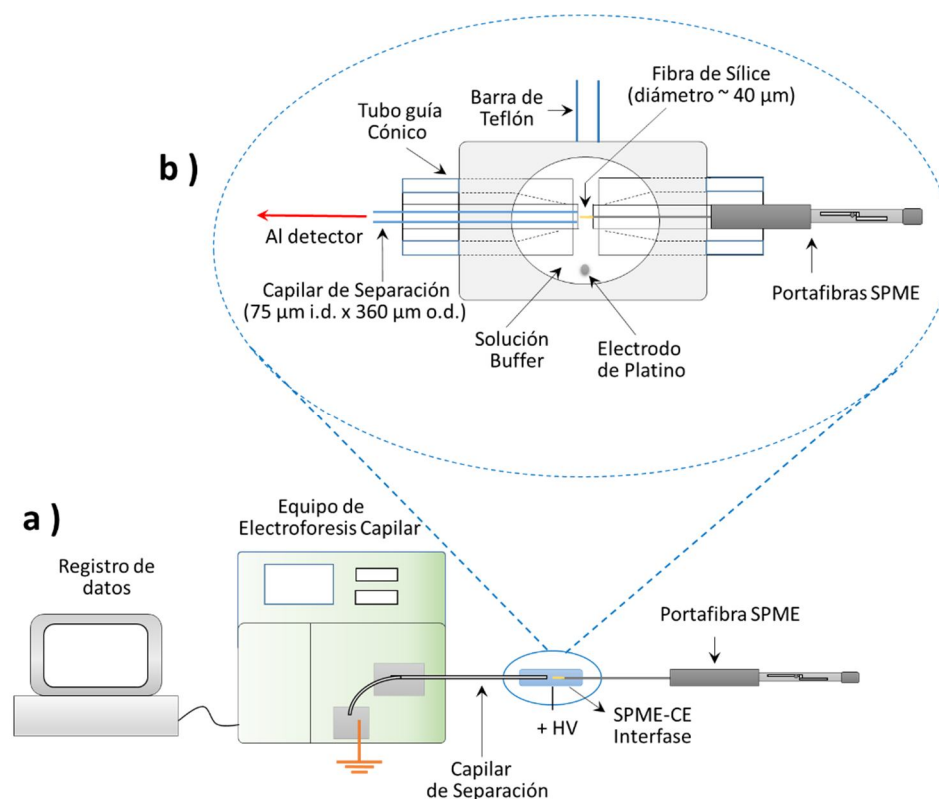


Figura 1-14. a) Esquema del Sistema SPME – CE, **b)** Interfase SPME-CE

Cuando la combinación de la SPME con la CE se realiza fuera de línea, el procedimiento es muy similar a la combinación de la SPME con la HPLC. Una de las formas de llevar a cabo esta combinación consiste en introducir la fibra que contiene los analitos retenidos en un capilar que contenga unos pocos microlitros de un solvente orgánico de manera que se produzca la disolución de los analitos seguida de la inyección hidrodinámica o electrocinética en el capilar de CE. En este caso, los principales inconvenientes son la mayor laboriosidad del proceso y que el factor de pre-concentración es bajo debido a que sólo una pequeña parte de los analitos desorbidos son inyectados en CE [93].

1.1.2.3.6.4. SPME / Espectrometría de Masas (MS).

SPME también se ha combinado la con espectrometría de masas (MS) directamente para la detección de analitos sin el empleo de la separación cromatográfica. La viabilidad de acoplar SPME con MS se ha investigado desde finales de 1990, pero su progreso no es tan bueno como el de SPME junto con técnicas cromatográficas. En la mayoría de casos, la interfase de SPME a MS es compleja y requiere una serie de modificaciones de la espectrómetro de masas [121]. En las últimas dos décadas, se han logrado avances sustanciales para el acoplamiento SPME con MS, con diferentes aplicaciones en diversos campos de investigación. El uso de diferentes estrategias, ha conseguido acoplar con éxito SPME con espectrometría de masas utilizado cinco tipos de ionización: (1) ionización electrónica (EI) –MS [122 - 125]; (2) plasma acoplado inductivamente (ICP) –MS [126 - 129]; (3) láser de desorción / ionización (LDI) –MS [130 - 134]; (4) fuentes de ionización química a presión atmosférica (APCI)–MS [135-138]; y, (5) con técnicas de ionización por electroespray ESI-MS [139 - 141] y desorción con ionización por electroespray DESI-MS [142 - 144]. En la figura 1-15 se muestra un diagrama con los diferentes acoplamientos SPME-MS [121].

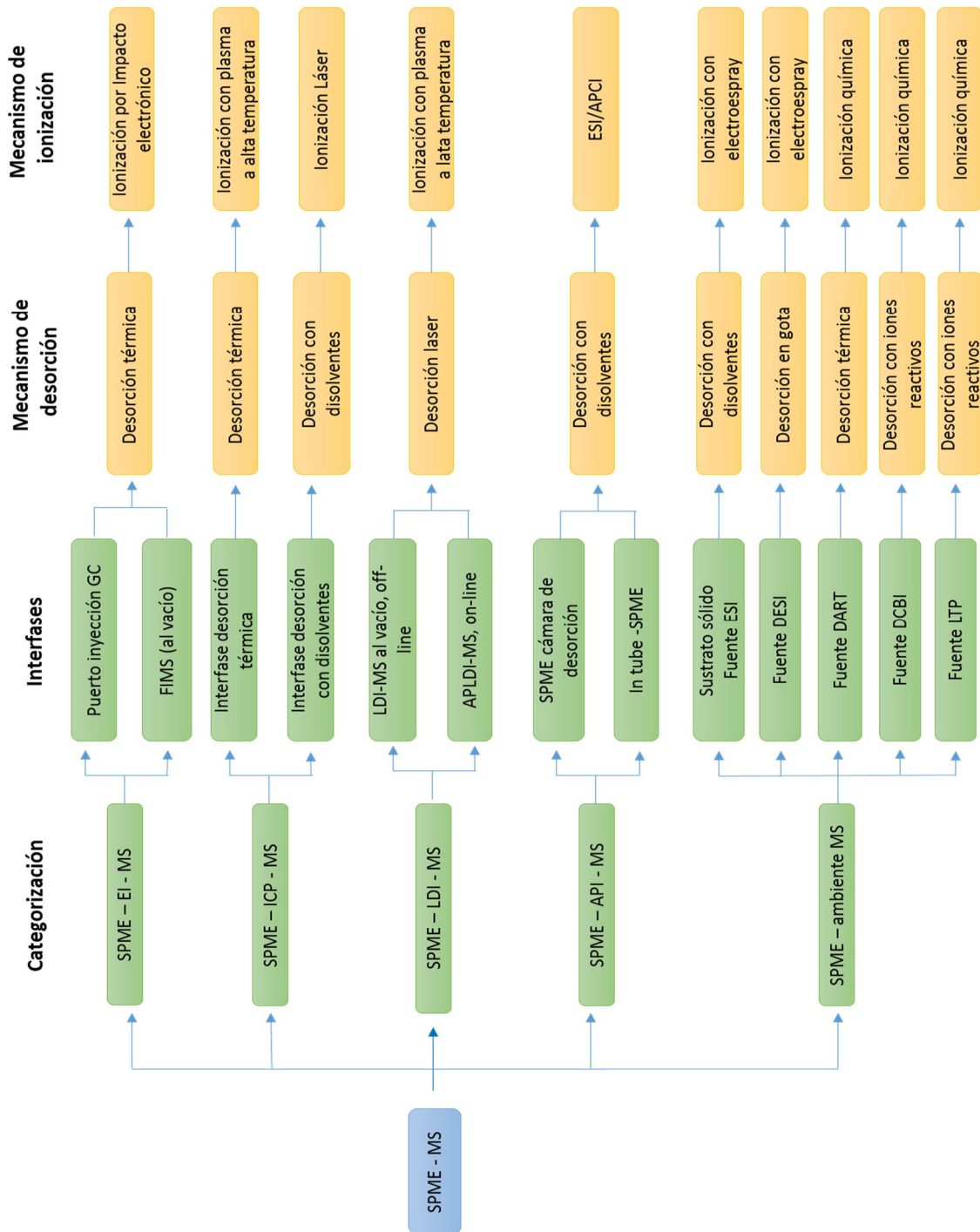


Figura 1-15. Categorización metodológica de la microextracción en fase sólida acoplada a espectrometría de masas.

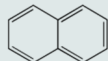


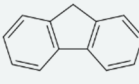

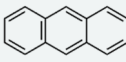
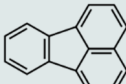
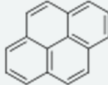
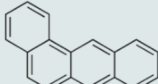
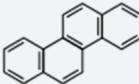
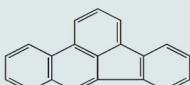
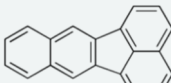

1.2. Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares (PAHs).

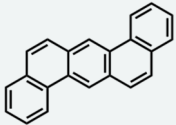
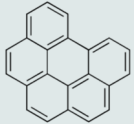
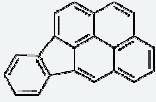
Los hidrocarburos aromáticos polinucleares son una clase de compuestos orgánicos que constan de 2 a 7 anillos aromáticos fusionados en forma lineal, angular, o arreglo agrupado, no contienen heteroátomos ni llevan sustituyentes.

Los PAHs se originan generalmente por la combustión incompleta de combustibles fósiles y biomasa; las emisiones relacionadas con el tráfico son una de las fuentes más importantes de PAHs en la atmósfera; muchos de ellos son tóxicos y bio-acumulables. La exposición de las personas a estos puede aumentar el riesgo de cáncer en niveles relativamente bajos; además de otros efectos adversos para la salud. Son de considerable preocupación sobre todo debido a su presencia ubicua en el medio ambiente y la carcinogenicidad bien reconocido, teratogenicidad y mutagenicidad [145, 146].

En la Tabla 1-5 se detallan los compuestos que se estudiarán en esta Tesis, incluyendo sus puntos de ebullición, fórmulas moleculares y su estructura molecular.

Tabla 1-5. Propiedades de los PAHs utilizados en la realización de este trabajo.

PAH	Formula Molecular	Punto de ebullición	Estructura Molecular
Naftaleno	$C_{10}H_8$	218 °C	
Acenaftileno	$C_{12}H_{10}$	265 °C	
Acenafteno	$C_{12}H_{10}$	279 °C	
Fluoreno	$C_{13}H_{10}$	295 °C	
Fenantreno	$C_{14}H_{10}$	340 °C	
Antraceno	$C_{14}H_{10}$	342 °C	
Fluoranteno	$C_{16}H_{10}$	375 °C	
Pireno	$C_{16}H_{10}$	393 °C	
Benzo (a) antraceno	$C_{18}H_{12}$	400 °C	
Criseno	$C_{18}H_{12}$	448 °C	
Benzo (b) fluoranteno	$C_{20}H_{12}$	481 °C	
Benzo (k) fluoranteno	$C_{20}H_{12}$	480 °C	
Benzo (a) pireno	$C_{20}H_{12}$	496 °C	

PAH	Formula Molecular	Punto de ebullición	Estructura Molecular
Dibenzo (a, h) antraceno	$C_{22}H_{14}$	524 °C	
Benzo (g, h, i) perileno	$C_{22}H_{12}$	545 °C	
Indeno (1,2,3-cd) pireno	$C_{22}H_{12}$	536 °C	

1.3. ASPECTOS ESPECÍFICOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN ESTE TRABAJO.

1.3.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.

Desde sus inicios, la microextracción en fase sólida [44] se ha utilizado ampliamente para extraer un gran número de compuestos en matrices medioambientales [147, 148, 149], biológicas [150, 151, 152] y alimentarias [153, 154, 155]. La ventaja de la SPME sobre otras técnicas como la extracción en fase sólida (SPE) es debida en gran parte, a su sencillez en la preparación de la muestra. Como se mencionó anteriormente, en esta técnica el proceso de extracción se lleva a cabo de dos maneras diferentes: en espacio de cabeza (HS) en la cual la fibra se expone en la fase de vapor por encima de la muestra líquida o sólida y la inmersión directa (DI) en la que la fibra se sumerge en la muestra líquida o gaseosa. Tras la etapa de

extracción, la desorción térmica SPME es la más utilizada en combinación con cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS), principalmente para compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y semi-volátiles [154, 156, 157]; además, esta técnica integra preparación e introducción de la muestra en un solo paso y permite el análisis completo automáticamente [150]. Por otro lado, la cromatografía líquida (LC) es la técnica usual para el análisis de compuestos de alto peso molecular, compuestos polares, térmicamente lábiles y con baja volatilidad no adecuados para GC o GC/MS. En este sentido, Supelco introdujo una versión comercial de la interfase manual para acoplar SPME con la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); dicha interfase se compone de una válvula de inyección de HPLC de seis puertos estándar a la cual se le adapta en el lugar que ocupa el bucle en la válvula una cámara desorción especial para la fibra de SPME [55, 154, 158, 159].

Varios autores han tratado de mejorar esta interfase introduciendo cambios en la metodología SPME-HPLC; estos incluyen la inversión de la dirección del flujo de disolvente en la interfase [160, 161], la reducción el volumen interno de la interfase [154, 161], la naturaleza del mecanismo de sellado [158], el calentamiento de la interfase para mejorar la eficacia de desorción [162, 163, 164], incluso han modificado la interfase de SPME/HPLC usando una válvula de inyección de 10 puertos y una unidad de reorientación C-8 [164]. Recientemente, han modificado una válvula Rheodyne 7520 para ser usada como interfase, a la cual se le incluyó un rotor para la etapa de desorción estática y desorción dinámica, obviando así, la interfase

tradicional de Supelco [120]. Sin embargo, hay razones por las que tales métodos no han sido ampliamente desarrollados, tales como que se dispone de un pequeño número de fibras comerciales disponibles para SPME/HPLC, el método no ha sido automatizado y esta metodología produce daños físicos a la capa absorbente de la fibra debido al paso de los disolventes durante la etapa de desorción, lo que limita la vida útil de las fibras [158, 160, 162, 166, 167]. Aun así, el método SPME/HPLC ha tenido un progreso sustancial debido a las ventajas que ofrece como complemento de la técnica SPME/GC.

En este estudio se modificó esta interfase para mejorar la sensibilidad, lo que incluye una extracción dinámica con flujo continuo de la muestra sobre la fibra y la aplicación de la vibración en la cámara de desorción durante el paso de extracción y desorción; a tal fin, se eligieron como compuestos "tests" para evaluar la metodología hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs), en concreto catorce, los cuales son considerados por la Agencia Estadounidense de Protección Ambiental (EPA) y la Unión Europea (UE) como contaminantes prioritarios [169].

1.3.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

Como se mencionó anteriormente, en SPME con fibras la desorción de los analitos se puede realizar mediante dos vías, (1) térmica que por lo general se lleva

cabo en el inyector de GC [44, 91, 155, 156], la cual es utilizada para analitos volátiles, (2) con disolventes on-line en HPLC para lo cual es necesaria una interfase; este método de desorción que es adecuado para compuestos de diferentes volatilidades [170 - 173]. Esta última metodología no está muy implantada, debido a que presenta inconvenientes en el proceso de desorción, tales como, (1) la fragilidad de la fibra ya que se puede romper fácilmente principalmente durante la inserción en la cámara de desorción [170]; (2) generación de burbujas de aire cuando la fibra es puesta en la interfase, (3) los disolventes orgánicos de la fase móvil y la presión que genera la bomba de HPLC en el interior de la cámara de desorción crean desgaste y dañan el revestimiento de la fibra disminuyendo su tiempo de vida [171- 175]; estos problemas se han evidenciado en nuestro laboratorio cuando se ha hecho uso de la interfase comercial de Supelco.

En este trabajo, se desarrolló una interfase SPME/HPLC Off-Line, en la cual el proceso de desorción de los analitos en la fibra se lleva a cabo térmicamente lo cual evita el contacto de la fibra con los disolventes orgánicos de la fase móvil; recolectándolos después de la desorción en una mezcla de disolventes orgánicos para posteriormente ser inyectados en el cromatógrafo de HPLC con detector de fluorescencia. Entre las ventajas que posee esta nueva interfase off-line es que se protege la fibra de posibles daños y del deterioro por contacto que ocurren al utilizar la interfase comercial on-line para HPLC.

1.3.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line

La contaminación del agua causada por las actividades humanas, se comienza a producir desde los primeros intentos de industrialización, para transformarse luego en un problema tan habitual como generalizado. Durante la revolución industrial, el aumento de los bienes de consumo y sus procesos de producción requerían de la utilización de una gran cantidad de agua para la transformación de las materias primas. A su vez, los efluentes de dichos procesos productivos eran vertidos en los cauces naturales de agua sin ningún tipo de depuración, con sus desechos contaminantes correspondientes. Aquí comenzó a extenderse el grave problema de la contaminación del agua [176].

En la actualidad, la contaminación del agua es un problema global inducido por el desarrollo económico y el crecimiento de la población, lo que conlleva a un aumento constante del número de industrias a ritmo acelerado por el desarrollo de la agricultura. La mayor parte de las fuentes de contaminación de las aguas superficiales se debe al sector de la agricultura [176 - 178] y a los desechos domésticos y municipales [179, 180] los cuales causan un gran daño a los ecosistemas y que suelen contener una amplia gama de contaminantes, como los patógenos [180, 181], sustancias orgánicas [182, 183], metales pesados [177, 184] y productos farmacéuticos [185, 186].

Pero sin lugar a dudas, la industria química, es una de las más contaminantes, debido a su crecimiento exponencial. Se calcula que se han producido y diseminado en el medio ambiente 100.000 nuevas sustancias químicas. Lo más preocupante es que el conocimiento del impacto de estas sustancias sobre el medio ambiente y la salud humana es escaso y, en la mayoría de los casos, no existe [187, 188].

La presencia de sustancias extrañas en el agua es uno de los mayores problemas que se presentan en nuestro medio natural. La introducción de contaminantes en las fuentes de agua por vertidos incontrolados de uso industrial provoca un impacto a corto, mediano o largo plazo sobre la fuente receptora; dicha descarga de contaminantes en la mayoría de las ocasiones es difícil de evidenciar debido al desconocimiento de horarios y días del vertido al afluente, lo que no hace posible un muestreo eficiente, teniendo como resultado el que los organismos oficiales de control no puedan ejercer una vigilancia eficaz sobre los vertidos al agua.

En esta investigación se desarrolló un dispositivo que permite realizar un muestreo continuo de los afluentes el cual involucra SPME y que permite evidenciar los puntos de vertido ilegales y ejercer una supervisión por las autoridades de control.

1.3.4. Determinación del sexo fetal mediante SPME/GC/MS

Una de las principales curiosidades de la madre embarazada es conocer el sexo de su bebé antes de nacer. Sin embargo, identificar el sexo fetal ofrece no sólo las respuestas a curiosidades sociales, sino también importante información clínica para el diagnóstico temprano de una variedad de enfermedades relacionadas con el sexo del feto, principalmente la enfermedad del cromosoma Y, como la hemofilia y la ligada al cromosoma X o suprarrenal congénita hiperplasia (CAH), la enfermedad de Duchenne o la enfermedad de Huntington [189 - 191].

Con el advenimiento de las técnicas de ultrasonido, la identificación prenatal del sexo del feto ha sido posible en los últimos años y se ha extendido a nivel mundial, aunque en algunos casos puede plantear dificultades [192, 193]. La determinación del sexo fetal mediante esta técnica no se debe hacer antes de la gestación de 12 semanas porque es relativamente inexacta. Después de 13 semanas, es preciso en 99% a 100% de los casos [189, 194]. Además, la precisión de la determinación de género depende de la experiencia y los conocimientos del ecografista, la resolución de la máquina utilizada y la posición que tiene el feto en el interior del vientre materno [195].

El reciente descubrimiento de la presencia de células de ADN fetal libre (cell-free fetal DNA - cffDNA) en el plasma materno y en el suero ha generado una forma

segura de evitar las pruebas prenatales invasivas como la amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas en embarazos de alto riesgo ligados al cromosoma X. [190, 195 - 198]; este material genético de las células fetales está presente en la sangre materna a partir de la sexta semana de gestación y se convierte en indetectable 2 horas después del nacimiento. La técnica más común que se utiliza actualmente para la detección e identificación de secuencias específicas cfDNA es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que analiza cuantitativamente la presencia del gen *SRY* en tiempo real. El gen *SYR* es específico del sexo masculino, ya que sólo está presente en el cromosoma Y, y si la detección del gen *SYR* en sangre materna es positiva indica que el feto es de sexo masculino, por el contrario su ausencia indica que el feto es de sexo femenino [199, 200]. También, se ha encontrado la presencia de ADN fetal masculino en la orina, pero debido a su baja concentración en la misma, introduce dificultades en la detección por PCR, razón por lo que esta fuente de muestra es inapropiada para el diagnóstico prenatal no invasivo. Otros fluidos donde se ha encontrado ADN fetal masculino son el líquido amniótico y líquido peritoneal [201, 202].

Recientemente, la SPME en espacio de cabeza (HS-SPME) ha demostrado ser una alternativa para el muestreo y pre-tratamiento de diversas muestras biológicas, que junto con el desarrollo de nuevos recubrimientos de biocompatibles ha abierto posibilidades para el análisis biomédico en matrices como: orina, sangre, plasma,

INTRODUCCIÓN

fluidos orales, corporales, cabello e inclusive estudios directos en seres vivos *in-vivo* [203 - 205].

Con este estudio se quiere aprovechar las múltiples ventajas de la técnica de HS-SPME-GC-MS para identificar marcadores volátiles en la orina materna, los cuales permitan determinar el sexo del feto en el primer trimestre de embarazo de una manera rápida, fácil y precisa.

2. PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los medios experimentales empleados en la realización de esta investigación.

2.1. Equipos.

- Cromatógrafo HPLC Agilent serie 1100 equipado con una bomba binaria, horno para el control de temperatura de la columna analítica, válvula de inyección manual de 6 puertos Rheodyne 7125 y detector de fluorescencia.

- Cromatógrafo de gases Varian CP 3800 equipado con inyector de temperatura programada (PTV), detector de espectrometría de masas/masas de trampa iónica (Rango 50 – 800 uma) Saturno 2200 Varian, acoplado a un inyector automático Combi PAL de CTC Analytics (Suiza).

- Cromatógrafo HPLC Waters 7225 Alliance equipado con control de temperatura para la columna, inyector Rheodyne 9125 de 6 puertos y detector de fluorescencia Agilent serie 1100.

- Agitador magnético PSelecta Agimatic 243 (Barcelona, España).

- Barras magnéticas agitadoras de diferentes dimensiones.

- Baño de ultrasonidos PSelecta 300512 (Barcelona, España).

PARTE EXPERIMENTAL

- Sistema de acondicionamiento y limpieza de fibras de 2 puertos Nurka 390 (Madrid, España), ver figura 2-1.

- Glass liner NK 390 0171 (Madrid, España).

- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo Modelo AX105DR (Suiza).

- Micropipetas de 0.5-10 μL , 10-100 μL y 200-1000 μL y 0,5-5 mL. Gilson (Middleton, USA).

- Jeringas de inyección manual para cromatografía de 10 μL para GC, 75 μL para HPLC y para bomba de infusión de 100 mL (Hamilton, Suiza).

- Bomba de infusión de jeringa KD Scientific kds200 (USA).

- Tubo de vidrio de fondo cónico (50 x 3 mm).

- Viales de 2, 10, 20 mL de vidrio con sello de aluminio, de apertura estándar, de 11 mm y 20 mm de diámetro, suministrados por Supelco (Bellefonte, USA).

-
- Encapsulador y desencapsulador de 11 mm y 20 mm de diámetro, The Finest in Crimping Tools & Accesories (USA).
 - Caja colector de vacío para SPE (Sigma Aldrich, USA).
 - Agitador Vortex UniEquip XZ3 Rango de trabajo 0 – 40 Hz (Planegg, Alemania).
 - Tubo de acero inoxidable de 1/16" de 30 cm de largo.
 - Cápsulas vibratorias adaptadas a la interfase SPME/HPLC.
 - Caja de acero inoxidable (25 cm x 25 cm x 25 cm) con paredes recubiertas en malla de 63 micras en acero inoxidable y soporte en el interior para microextracción en fase sólida simultánea con 4 fibras, ver figura 2-2.
 - Bomba de agua Eheim 3.400 L/hora (Deizisau, Alemania).
 - Contenedores plásticos de 40 Litros, IKEA (Suecia).
 - Recipientes plásticos para toma de muestra de orina 20 mL.

2.2. Dispositivos de Microextracción en fase Sólida.

- Portafibras Manual (Holder) SPME para GC y HPLC, Supelco (Bellefonte, USA).

- Fibras para microextracción: caboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) StableFlex - 85µm, polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) - 65 µm, polidimetilsiloxano (PDMS)-100 µm, poliacrilato (PA)-85 µm, polidimetilsiloxano (PDMS) - 7 µm.

- Interface SPME/HPLC, Supelco (Bellefonte, USA).

- Soporte para SPME provisto de rotor para proveer de giro a la fibra durante la extracción.



Figura 2-1. Sistema de acondicionamiento y limpieza de fibras de 2 puertos Nurka 390.



Figura 2-2. Dispositivo de muestreo SPME on-line.

2.3. Gases, disolventes y reactivos.

- Argón Premier, pureza del 99.9992% (Carbueros Metálicos, Aranjuez, España).

- Helio Premier, pureza del 99.9992% (Carbueros Metálicos, Aranjuez, España).

- Metanol, grado HPLC - Scharlau (Barcelona, España).

- Acetonitrilo Scharlau, grado HPLC - Scharlau (Barcelona, España).

- Agua purificada con un Sistema Milli-Q - Millipore (Milford, USA).

- Hidróxido de sodio extra-puro 30% w/v - Scharlau (Barcelona, España).

2.4. Patrones.

- Estándares primarios de PAHs fueron obtenidos de Sigma Aldrich, Naftaleno 99.0%, Acenafteno 99.0%, Fluoreno 98.0%, Fenantreno 98.0% y antraceno con pureza del 99.0%.

- Mezcla de 16 Hidrocarburos aromáticos polinucleares TCL PAH No. 49156 compuesta por naftaleno 500 µg/mL, acenaftileno 500 µg/mL, acenafteno 1000 µg/mL, fluoreno 100 µg/mL, fenantreno 40 µg/mL, antraceno 20 µg/mL, fluoranteno 50 µg/mL, pireno 100 µg/mL, benzo(a)antraceno 50 µg/mL, criseno 50 µg/mL, benzo(b)fluoranteno 20 µg/mL, benzo(k)fluoranteno 20 µg/mL, benzo(a)pireno 50 µg/mL, dibenzo(a,h)antraceno 200 µg/mL, benzo(g,h,i)perileno 80 µg/mL e indeno(1,2,3-cd)pireno 50 µg/mL, obtenidos de Supelco y con pureza superior a 99.999%.

- Patrón con mezcla de compuestos volátiles 54 VOC's EPA 502/524 adquirida en Supelco (Benceno, Bromobenceno, Bromoclorometano, Bromodiclorometano, Bromoformo, Butilbenceno, *sec*-Butilbenceno, *terc*-Butilbenceno, Tetracloruro de carbono, Clorobenceno, Cloroformo, 2-Clorotolueno, 4-Clorotolueno, Dibromoclorometano, 1,2-Dibromo-3-cloropropano, 1,2-Dibromoetano, Dibromometano, 1,2-Diclorobenceno, 1,3-

Diclorobenceno, 1,4-Diclorobenceno, 1,1-Dicloroetano, 1,2-Dicloroetano, 1,1-Dicloroetileno, cis-1,2-Dicloroetileno, trans-1,2-Dicloroetileno, Diclorometano, 1,2-Dicloropropano, 1,3-Dicloropropano, 2,2-Dicloropropano, 1,1-Dicloro-1-propano, cis-1,3-Dicloropropano, trans-1,3-Dicloropropano, Etilbenceno, Hexacloro-1,3-butadieno, Naftaleno, Propilbenceno, estireno, 1,1,1,2-Tetracloroetano, 1,1,2,2-Tetracloroetano, Tetracloroetileno, Tolueno, 1,2,3-Triclorobenceno, 1,2,4-Triclorobenceno, 1,1,1-Tricloroetano, 1,1,2-Tricloroetano, Tricloroetileno, 1,2,3-Tricloropropano, 1,2,4-Trimetilbenceno, o-Xileno, m-Xileno, p-Xileno).

- Patrón de Diésel de 5.000 µg/mL; naftaleno 99.0%, Benzo(a) antraceno 99.0%, dibenzo(a,h) antraceno 99.0% y antraceno 99.0%; patrón de piriproxifen; todos obtenidos de Sigma-Aldrich (ST.Louis, USA).
- Cloruro de sodio (NaCl, 99,5% de pureza), ácido clorhídrico (HCl 37%) e hidróxido de sodio (solución al 30% w/v extrapure), adquiridos en Scharlou (España).

2.5. Preparación de disoluciones.

- Disoluciones patrón de cada uno de los PAH se prepararon en metanol en las siguientes concentraciones: naftaleno 676,8 mg/L, acenafteno 807,3 mg/L, fluoreno 498,9 mg/L, fenantreno 437,1 mg/L y antraceno 160,2

PARTE EXPERIMENTAL

mg/L; estas disoluciones estándar se almacenaron a 4°C en frascos ámbar de 100 mL. Partiendo de las diluciones anteriores se preparó una mezcla de 5 PAHs, preparada a partir de las diluciones patrones de cada PAH; 250 µL de naftaleno; 180 µL de acenafteno, 160 µL de fluoreno, 60 µL de fenantreno y 30,0 µL de antraceno en un matraz aforado de 2 mL (Schott Duran) en metanol; estas soluciones estándar diluidas se homogeneizaron en el baño de ultrasonidos durante cinco minutos.

- Partiendo de la mezcla TCL PAH No. 49156, fue preparada una disolución tomando 100 µL de la mezcla de PAHs y se diluyeron con metanol en un matraz de 10 mL; esta solución estándar diluida fue homogeneizada en el baño de ultrasonidos durante cinco minutos. La disolución estándar fue almacenada en un vial de 2 mL color ámbar y a 4°C hasta su uso. El acenaftileno y el indeno (1,2,3-cd) pireno no fueron incluidos en este estudio por presentar una señal poco sensible con el detector de fluorescencia.
- Disolución estándar "test de volátiles" conteniendo 10 mg/L de piriproxifen, Naftaleno, Benzo(a) antraceno, dibenzo (a,h) antraceno, antraceno y 100 mg/L de Diésel. Esta solución estándar fue homogeneizada en el baño de ultrasonidos durante cinco minutos.

2.6. Sistema Cromatográfico.

2.6.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.

El análisis de los PAHs se llevó a cabo en un equipo modular de HPLC, Agilent serie 1100, dotado con una columna cromatográfica Phenomenex Envirosep PP (125 × 4,6 mm), un inyector manual de seis puertos Rheodyne 7125 al cual se le adaptó una intersase para SPME de Supelco.

El método cromatográfico se configuró con un gradiente comenzando con 55:45 de agua:acetonitrilo (v:v) durante 2 minutos; incrementando el contenido de acetonitrilo a 90% en 25 minutos; luego se regresó a la composición inicial durante 15 minutos. El caudal de la fase móvil fue de 1,0 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 35,0°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). En la figura 2-3 se muestra el gradiente de la fase móvil empleado.

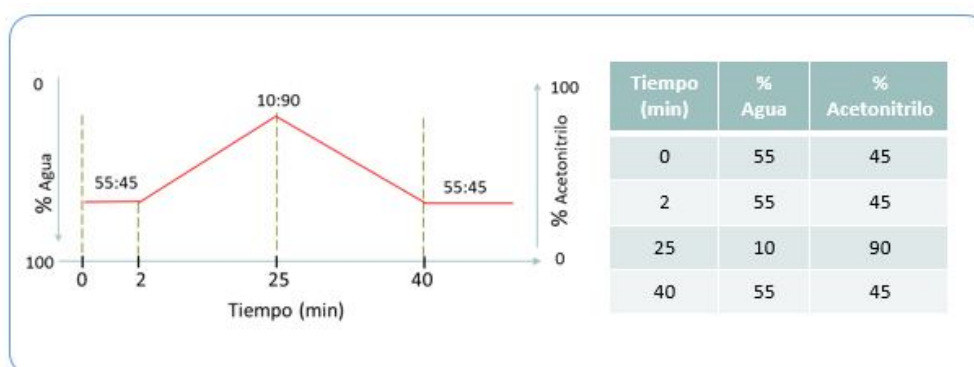


Figura 2-3. Gradiente de la fase móvil utilizado para la separación de los PAHs.

2.6.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

Para el análisis de los PAHs se utilizó el sistema especificado en la sección 2.5.1., con la diferencia que al inyector Rheodyne 7125 le fue adaptado un bucle de inyección de 20 μ l.

El gradiente aplicado inició con 55:45 de agua:acetonitrilo (v:v) durante 2 minutos; incrementando el contenido de acetonitrilo a 90% en 23 minutos. En la figura 2-4 se muestra el gradiente de la fase móvil empleado.

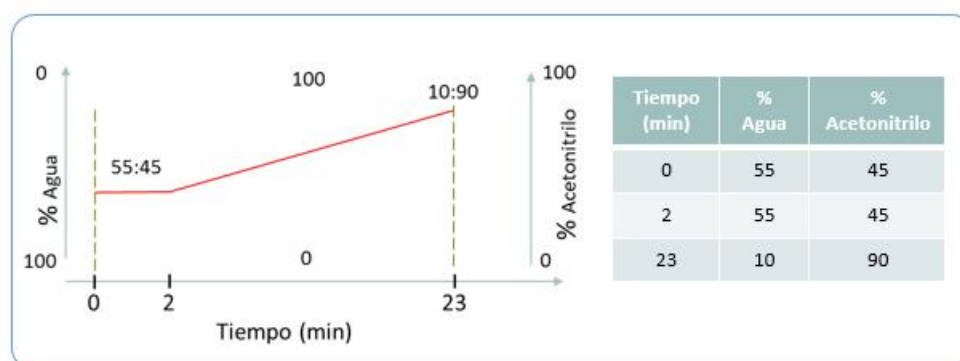


Figura 2-4. Gradiente de la fase móvil utilizado para la separación del naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno.

2.6.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.

El análisis GC-MS se realizó mediante un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones Varian

Saturno 2.200. Se utilizó un inyector automático CombiPAL para todos los experimentos. El inyector se calentó a 270°C y las inyecciones se realizaron en el modo splitless durante 5 min. Para separar los analitos se utilizó una columna ZB-5MS (30 m, ID 0,25 mm, espesor de la película 0,25 μm) de Phenomenex, EE.UU; el gas portador fue helio a un caudal constante de 1 mL/min. El programa de temperatura del horno se inició en 45°C durante 10 minutos, luego se llevó la temperatura a 290°C con una rampa de 5°C/min y se mantuvo durante 5 minutos; por último, se llevó a 300°C a 5°C·min⁻¹ y se mantuvo a esta temperatura durante 1 minuto (tabla 2-1).

2.6.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME / CG / MS.

En este estudio se utilizó el mismo sistema y configuración especificado en la sección 2.5.3 (tabla 2-1).

Tabla 2-1. Resumen de los principales parámetros del método analítico.

CROMATOGRAFO DE GASES			
INYECTOR		COLUMNA	
Temperatura: 270 °C		Phenomenex ZB-5MS	
Modo de operación:		Dimensiones: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	
Para SPME: splitless (5 min)		Gas portador: He	
		Flujo: 1 mL/min	
PROGRAMA DE TEMPERATURA			
Rampa	Velocidad (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tiempo final (min)
1		45	10
2	5	290	59
3	25	300	70
Duración total del análisis: 70 min			
ESPECTRÓMETRO DE MASAS			
Modo SCAN: full scan Rango de masas : 40-550 m/z		Solvent Delay: 0 min (SPME)	
Velocidad de barrido : 6 scan/s		Temp. de línea de transferencia: 280°C	

2.7. Identificación de los analitos.

2.7.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.

Los PAHs se identificaron utilizando un detector de fluorescencia Agilent 1100 el cual tiene como características importantes su alta sensibilidad y selectividad con analitos fluorescentes; para ello se ajustaron las longitudes de

onda de excitación (λ_{Ex}) y emisión (λ_{Em}) óptimas para cada uno de los cinco PAHs se muestran en la tabla 2-2.

Tabla 2-2. Longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para cada PAH.

PAH	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)
Naftaleno	274	335
Acenafteno	266	315
Fluoreno	266	315
Fenantreno	249	365
Antraceno	251	420
Fluoranteno	359	452
Pireno	335	390
Benzo (a) antraceno	270	390
Criseno	352	445
benzo (b) fluoranteno	315	425
benzo (k) fluoranteno	290	412
benzo (a) pireno	295	404
dibenzo (a, h) antraceno	205	420
benzo (g, h, i) perileno	266	500

2.7.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

El procedimiento de identificación de los PAHs en este trabajo son los mismos especificados en el apartado 2.6.1.

2.7.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.

Para la identificación de los analitos se utilizó un espectrómetro de masas con trampa de iones Varian Saturno 2.200, el cual fue configurado con una ionización de impacto electrónico (EI) a 70 eV en el modo de barrido completo (full-scan) en un rango entre 40 a 550 m/z, con una velocidad de barrido de 6 scan/s. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 280°C. La identificación de los compuestos volátiles detectados se ha realizado por comparación de espectros de masas con la librería espectral del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología NIST MS 2.0,

2.7.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME / CG / MS.

La detección y caracterización de los VOC's se realizó siguiendo el procedimiento especificado en el apartado 2.6.3.

2.8. Procedimiento SPME.

2.8.1. Acondicionamiento de la fibra.

A lo largo de este trabajo se emplean diferentes tipos de fibras, las cuales deben ser acondicionadas previamente a su utilización. Para este propósito, se emplea un dispositivo independiente limpiador/acondicionador de fibras

NURKA 390 configurado con las condiciones recomendadas por el fabricante. Un blanco de fibra se registró diariamente antes de su utilización. En la tabla 2-3 se muestran los tiempos y temperaturas empleados en el acondicionamiento inicial de las fibras utilizadas.

Tabla 2-3. Condiciones de trabajo y acondicionamiento recomendadas por SUPELCO para las fibras de SPME.

Material Absorbente	Espesor Fase (μm)	Temp. Máxima ($^{\circ}\text{C}$)	T. Trabajo ($^{\circ}\text{C}$)	T. Acondicion. ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (horas)
PDMS	100	280	200-280	250	0,5
PDMS	30	280	200-280	250	0.5
PDMS	7	340	220-320	320	1
PDMS/DVB	65	270	200-270	250	0,5
Poliacrilato	85	320	220-300	280	1
Carboxen / PDMS	85	320	250-310	300	1
PEG	60	250	200-250	240	0,5
DVB/CAR/PDMS	50/30	270	230-270	270	1

2.8.2. Extracción dinámica HPLC / SPME.

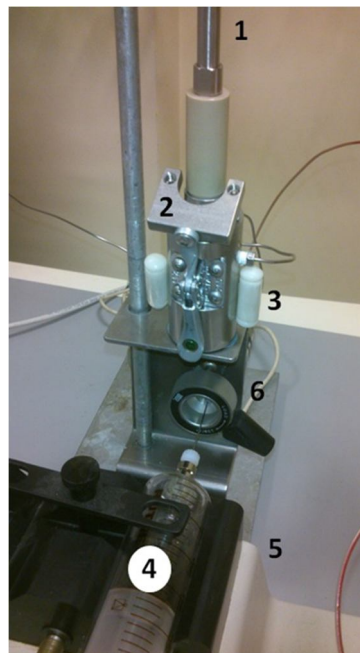
2.8.2.1. Proceso de extracción dinámica.

Para llevar a cabo la extracción de los analitos se probaron diferentes fibras de Supelco CAR/PDMS 85 μm StableFlex, PDMS 100 μm , PDMS 7 μm y PDMS/DVB 65 μm .

La extracción de los PAHs se realizó de un modo dinámico; para optimizar esta metodología se preparó una muestra adicionando 50 μL de la solución diluida de PAHs en 100 mL de agua milli-Q con agitación en una plataforma (PSelecta Agimatic 243) a 1.200 rpm durante 10 minutos antes de iniciar el proceso de SPME; seguidamente los 100 mL de la muestra fueron transferidos a una jeringa de 100 mL (Hamilton, Bonaduz, Schwiz); enseguida, la aguja de la jeringa se introdujo en la válvula del inyector Rheodyne 7125 de 6 puertos en posición el cual se encuentra en posición "load" para permitir el paso de la muestra a través de la cámara de desorción. Por otra parte, la fibra de SPME se situó en la cámara de desorción de la interfase Supelco y se expuso la fibra. El proceso de extracción se realizó por contacto de los analitos con la fibra, pasando los 100 mL de la muestra por infusión desde la jeringa a un flujo de 1,0 mL/min. Durante todo el proceso de extracción se aplicó vibración a la

interfase a temperatura ambiente (24-26°C). En la figura 2-5 se muestra el montaje experimental para el proceso de extracción.

a)



b)

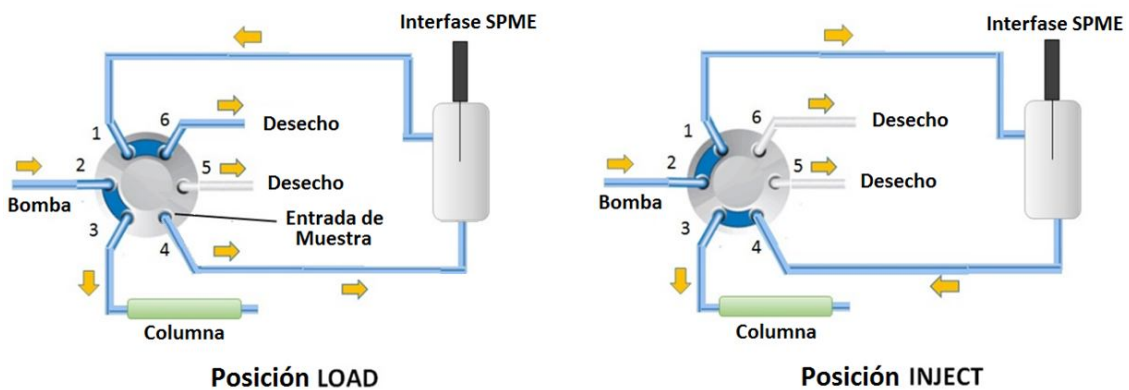


Figura 2-5 a) Interfase Supelco modificada para realizar extracción dinámica. 1. Holder SPME, 2. Interfase SPME/HPLC Supelco, 3. Mecanismo de vibración, 4. Jeringa con la muestra, 5. Bomba de infusión, 6. Inyector de 6 puertos HPLC. **b)** Ruta de flujo de la muestra en el inyector durante el proceso de extracción dinámica.

2.8.2.2. Proceso de desorción.

Para desorber los analitos retenidos en la fibra, es retirada la jeringa que contenía la muestra y manteniendo la válvula en posición de "load" se inyectan en la cámara de desorción 90 μ L de Acetonitrilo:Metanol, 50:50, v:v, que es volumen necesario para llenar completamente la cámara y desplazar la muestra restante de la misma. A continuación, se realiza la desorción estática con vibración en la cámara durante 3 min; pasado este tiempo, la válvula se coloca en la posición "inject" arrastrando durante 30 seg los analitos extraídos mediante el paso de fase móvil hacia la columna analítica. Durante todo el proceso de desorción es aplicada vibración a la interfase.

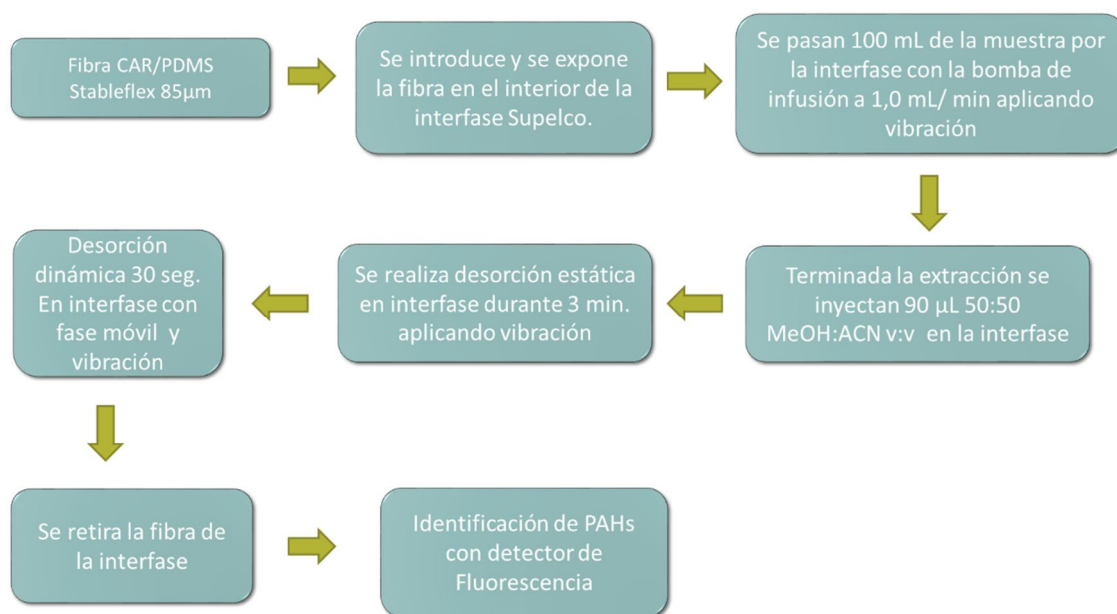


Figura 2-6. Esquema del procedimiento de microextracción y desorción utilizando la extracción dinámica con vibración en todo el proceso.

2.8.3. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

2.8.3.1. Proceso de extracción.

En el proceso de microextracción en fase sólida se utilizó un soporte manual de fibra el cual fue fabricado en el laboratorio para ser incorporado a un rotor para dar movimiento giratorio a la fibra en el sentido contrario a la agitación de la muestra, lo que asegura una extracción más eficiente de los analitos en la fibra. En la extracción se probaron las fibras de Supelco CAR/PDMS 85 μm StableFlex, PDMS 100 μm , PDMS 7 μm y PDMS/DVB 65 μm .

Los PAHs se extrajeron por inmersión directa de la fibra en 100 mL de la muestra líquida, la cual se colocó en un agitador magnético a 3000 rpm (50Hz) durante 90 minutos utilizando una barra magnética forrada con vidrio; la fibra también fue provista de movimiento a 600 rpm (10 Hz) en un rotor en dirección opuesta al agitador magnético. Todas las extracciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (24°C-26°C). Una vez terminado el proceso de extracción se llevó a cabo la desorción térmica de los analitos. En la figura 2-7 se muestra un esquema de los dispositivos utilizados en la extracción.

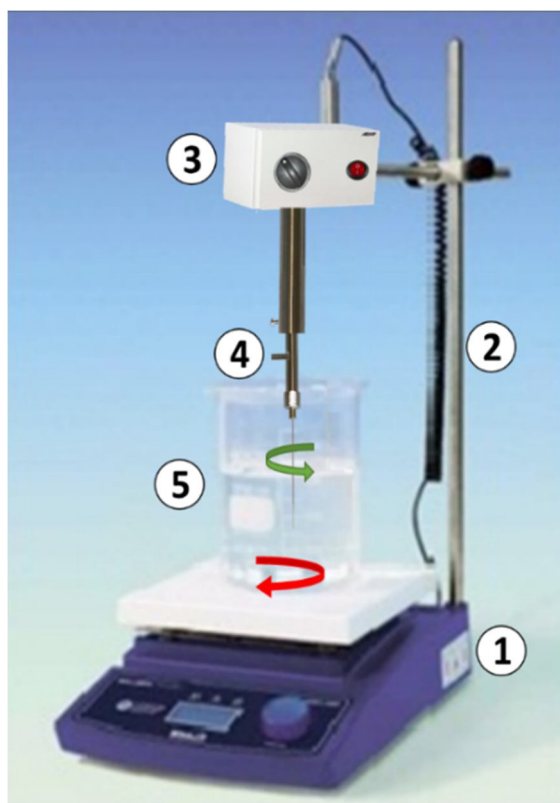


Figura 2-7. Esquema del montaje para realizar el proceso de microextracción en fase sólida en agua, **1)** Placa Agitadora; **2)** Soporte Universal; **3)** Rotor; **4)** Portafibras para fibra SPME; **5)** muestra de PAHs.

2.8.3.2. Interfase desorción térmica y recolección de analitos en disolventes orgánicos.

2.8.3.2.1. Descripción del sistema.

Esta interfase esencialmente consiste en una cámara de desorción térmica, que se encuentra situada en un bloque metálico el cual posee un control de temperatura en un margen entre 30°C–340°C; en el interior de éste se encuentra un glass liner en el cual se introduce la fibra de SPME para llevar a

cabo la desorción de los analitos que son arrastrados por un flujo de argón controlado mediante un manómetro. El glass liner se conecta a un microtubo de vidrio con fondo cónico de 50 x 3 mm utilizando un tubo de acero inoxidable de 1/16 " el cual termina en la parte inferior del microtubo de vidrio al que se le ha adicionado con anterioridad un disolvente, el microtubo se introduce en un baño de hielo para ayudar a la retención de los analitos en el disolvente. Un esquema de esta interfase se muestra en la figura 2-8.

a)



b)

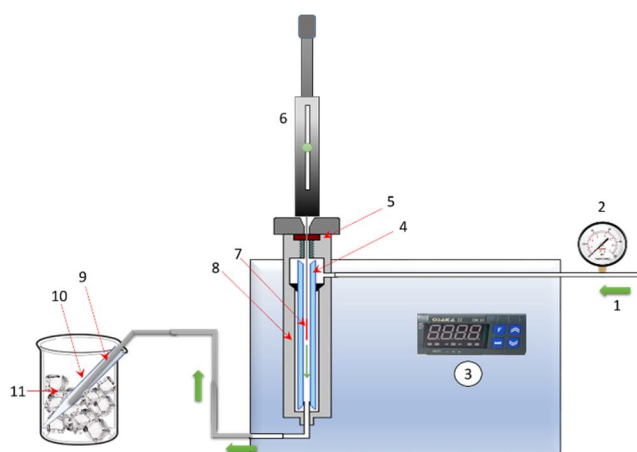


Figura 2-8. a) Vista de la interfase; **b)** Esquema de la interfase: 1) Entrada de gas argón, 2) Manómetro, 3) Termostato, 4) Glass liner, 5) Septum, 6) Holder, 7) Fibra SPME, 8) Boque metálico, 9) Tubo de acero, 10) Microtubo, 11) Baño de hielo.

2.8.3.2.2. Desorción térmica y recolección de los analitos en el disolvente.

La desorción térmica de los analitos se realiza introduciendo la fibra en el interior del glass liner calentado a 270°C durante 30 min con un flujo de argón de 7 mL/min tras retirar la fibra se inyectaron cuatro alícuotas de 10 µL de metanol cada 5 minutos en el glass liner a la misma temperatura con el objetivo de arrastrar cualquier residuo de PAHs condensada en el interior del tubo de conexión. Los analitos se recogieron en 100 µL de una mezcla 50:50 metanol:acetonitrilo colocada en el interior del microtubo de recolección el cual se encuentra en un baño de baño de hielo. Al finalizar el proceso de desorción el volumen del disolvente de recolección se lleva a 50 µL, de los cuales se inyectan 20 µL en el HPLC.



Figura 2-9. Esquema del procedimiento de microextracción y desorción utilizado la nueva interfase.

2.8.4. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.

2.8.4.1. Descripción del dispositivo.

Consta de una caja cúbica de acero inoxidable de 25 cm x 25 cm x 25 cm con paredes de malla de 63 micras en acero inoxidable que contiene un soporte en el interior para la instalación simultánea de las 4 fibras, cada una de las cuales va instalada en un portafibras fabricado para su ajuste en dicho soporte, ver figura 2-2.

2.8.4.2. Proceso de extracción.

Se utilizaron cuatro tipos de fibras con diferentes polaridades y/o espesores: 85 μm poliacrilato (PA), 100 μm polidimetilsiloxano (PDMS), 7 μm polidimetilsiloxano (PDMS) y 85 μm carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) Stableflex. Las cuatro fibras fueron acondicionadas antes de su uso de acuerdo con las especificaciones del fabricante (tabla 2-3). Una vez instaladas las fibras en la la caja se introdujo en las aguas del río objeto del estudio y se dejaron estar durante diferentes tiempos, 1, 3 y 7 días. Pasado el tiempo de extracción se lava el exterior de las fibras con agua destilada para eliminar posibles impurezas. Se tomaron datos de profundidad a la que se colocó la caja, la temperatura y el caudal del agua.

2.8.4.3. Proceso de desorción.

El proceso de desorción de los analitos retenidos en los recubrimientos poliméricos se llevó a cabo en el inyector del cromatógrafo de gases en modo splitless durante 5 min a 270°C. Un blanco de la fibra se realizó antes de cada análisis.

2.8.5. Determinación del sexo fetal por HS-SPME / CG / MS.

2.8.5.1. Proceso de extracción.

En este estudio fueron utilizadas tres tipos de fibras diferentes: 7 µm polidimetilsiloxano (PDMS), 100 µm polidimetilsiloxano (PDMS) y 85 µm Carboxen/polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS) Stableflex. Todas las fibras fueron acondicionadas antes de su uso de acuerdo con las especificaciones del fabricante (tabla 2-3). Para el proceso de extracción, todas las fibras fueron expuestas en las mismas condiciones a 2 mL de la muestra en viales de 20 mL en el modo espacio de cabeza. Los viales fueron sellados con un septum de teflón (Politetrafluoroetileno-PTFE) y un tapón de rosca de aluminio. Para la extracción de los analitos, la fibra fue expuesta durante 60 minutos al espacio de cabeza de la muestra de orina a 90°C. La inyección se realizó mediante el muestreador automático Combi-PAL. Una vez la extracción fue completa, se realizó la desorción térmica exponiendo la fibra en el interior del puerto de

inyección del cromatógrafo de gases en modo splitless a 270°C durante 5 minutos. Un blanco de la fibra se realizó antes de cada análisis. En la tabla 2-4 se resumen los parámetros del automuestreador combiPal.

Tabla 2-4. Parámetros de configuración del CombiPAL.

Temperatura del Agitador	90°C
Tiempo de Pre-incubación	1 min.
Velocidad agitación pre-incubación.	500 rpm
Velocidad agitación extracción	250 rpm
Tiempo de extracción	1 hora
Tiempo de desorción	25 min.

2.9. Procedimiento Extracción en fase sólida (SPE).

Para la comparación de la metodología propuesta con un método de referencia se realizó la extracción de los PAHs utilizando el método 550.1 de la EPA (Agencia Protección Ambiental) para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en el agua mediante extracción en fase sólida y HPLC con detección de fluorescencia [169].

PARTE EXPERIMENTAL

La extracción y purificación de las muestras se realiza utilizando cartuchos "Sep-Pack" Vac C18 de 1 g. Dichos cartuchos requieren un acondicionamiento previo al proceso de extracción para activar el empaquetamiento antes de la preconcentración de la muestra.

El acondicionamiento consiste en pasar a través del cartucho, tres disolventes en tres pasos sucesivos:

1. 4 alícuotas de 10 mL de cloruro de metilo.
2. 4 alícuotas de 10 mL de Metanol.
3. 2 alícuotas de 10 mL de agua milli-Q, no dejando secar el cartucho.

Inmediatamente, se pasa 1 L de la muestra de agua a través del cartucho con una presión entre 8-10 mm Hg, se lava el cartucho con 10 mL de agua milli-Q y se deja secar durante 10 min en el sistema de vacío.

Los PAHs son eluidos desde el cartucho con 2 porciones de 5 mL de cloruro de metilo a un caudal de 0.5 mL/min. Ambas porciones se recogen en un mismo tubo. Seguidamente, se procede a la evaporación del disolvente con el sistema de extracción a vacío, colocando el tubo de extracción en un vaso de agua a temperatura ambiente, para evitar la congelación del disolvente.

El residuo seco que queda en el tubo de extracción se disuelve en 1 mL de metanol con la ayuda de un baño de ultrasonidos durante 5 min. Una porción de 3 mL de acetonitrilo se añade al extracto y por último se concentra hasta un volumen final de 0,5 mL. Las concentraciones de PAHs en el extracto se determinan inyectando 20 μ L en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) equipado un detector de fluorescencia.

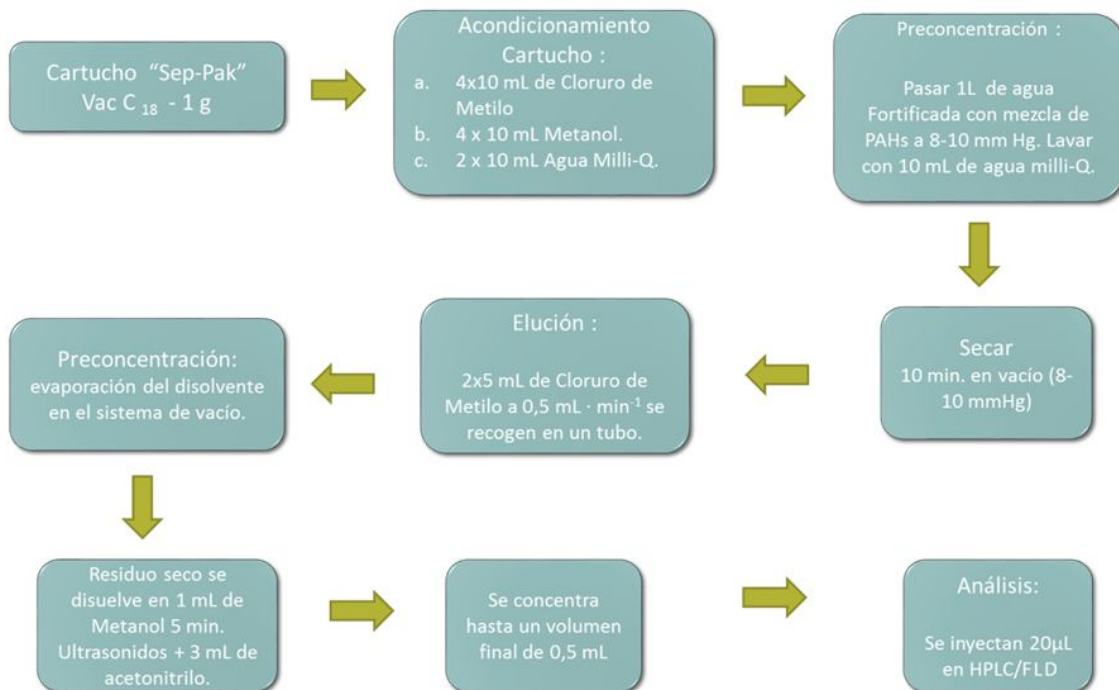


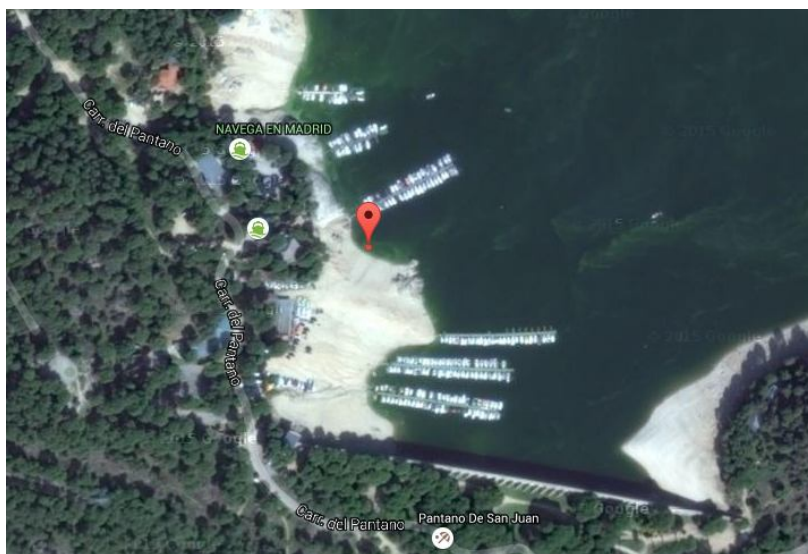
Figura 2-11. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida utilizando el método EPA 550.1.

2.10. Muestras.

2.10.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.

En la realización de este trabajo se analizaron muestras de agua del Pantano de San Juan y del rio Guadalix ubicados en la Comunidad de Madrid. Las muestras fueron recolectadas en botellas de vidrio Pyrex de borosilicato color ámbar y almacenadas a 4°C. La temperatura del agua en el momento de la toma de la muestra del Pantano de San Juan era de 19°C, la muestra se obtuvo en el punto GPS. 40° 22' 16.1184"N 4° 19' 10.4016"W; la muestra tomada del rio Guadalix tenía una temperatura de 16°C al momento de la toma y fue recolectada en las coordenadas GPS. 40°47'07.7"N 3°40'59.1"W.

a)



b)

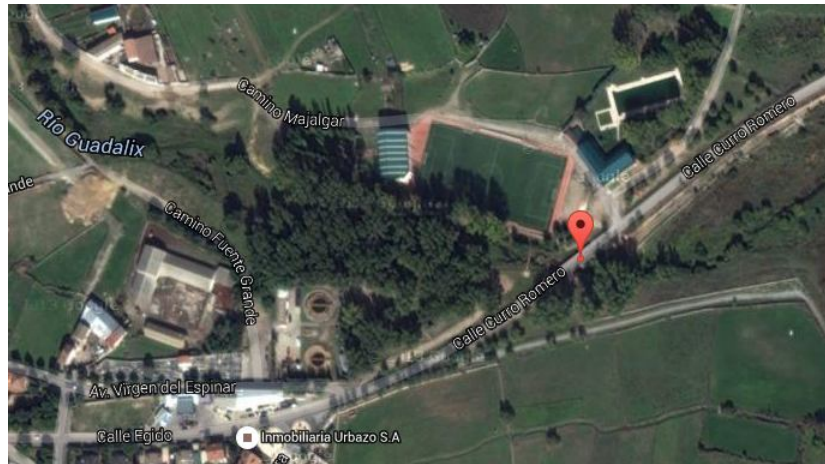


Figura 2-12. Puntos de toma de muestra **a)** Pantano de San Juan; **b)** Río Guadalix.

2.10.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

Se tomaron muestras de agua del Pantano Valdemayor tomadas a una temperatura de 9°C en el punto GPS. 40°34'39.8"N 4°02'35.4"W (figura 2-10). La muestra tomada del río Guadalix tenía una temperatura de 8°C al momento de la toma y fue recolectada en las coordenadas GPS. 40°47'07.7"N 3°40'59.1"W (figura 2-12 b). El procedimiento de toma y almacenamiento se especifica en el literal 2.9.1.

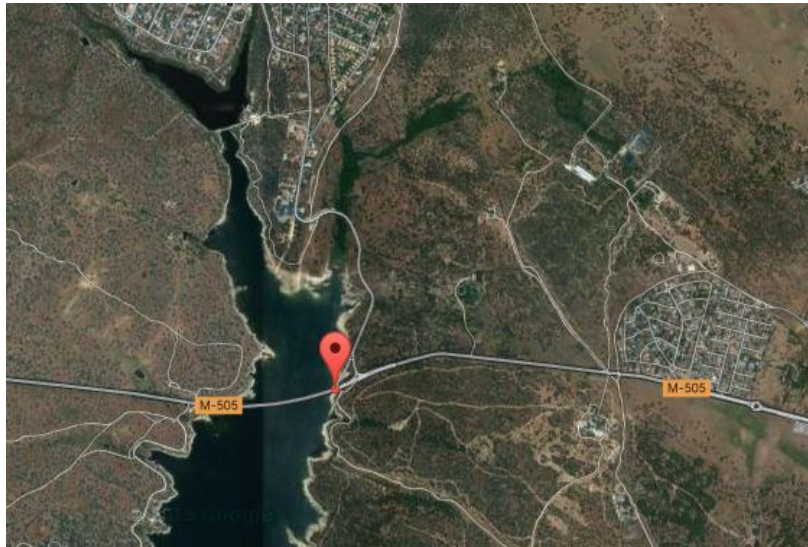
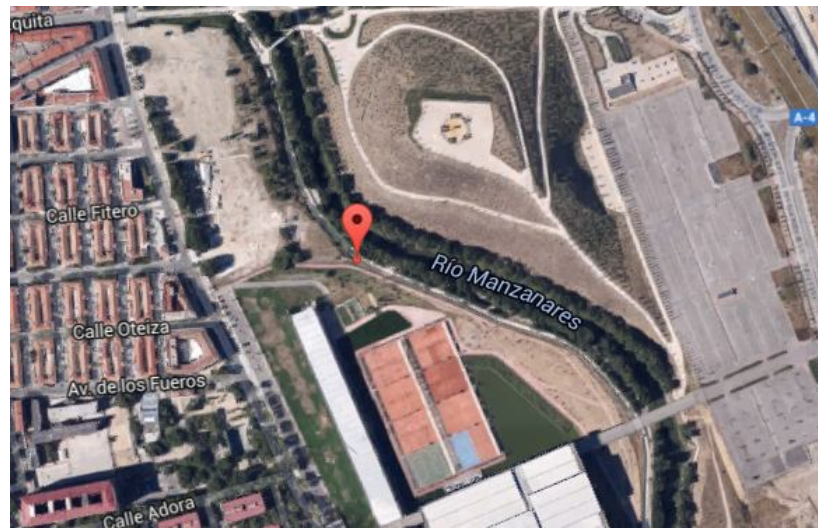


Figura 2-13. Sitio de toma de muestra en el Pantano de Valdemayor.

2.10.3. Desarrollo de un sistema de muestreo on-line.

Se realizó muestreo en los ríos de la comunidad de Madrid. En el río Manzanares a la altura del parque lineal del Rio Manzanares, después de su paso por Villaverde en las coordenadas GPS 40° 22' 17.67" N 3° 41' 9.96" W. En el río Jarama el dispositivo de muestreo fue puesto en el punto kilométrico 9 de la carretera M-203 entre Vicálvaro y Mejorada del Campo en las coordenadas 40° 23' 43.5336"N 3° 30' 34.3152"W. La temperatura del agua en el momento de la toma de la muestra era de 10°C, y 12°C para el rio Manzanares y para el rio Jarama, respectivamente (figura 2-14).

a)



b)

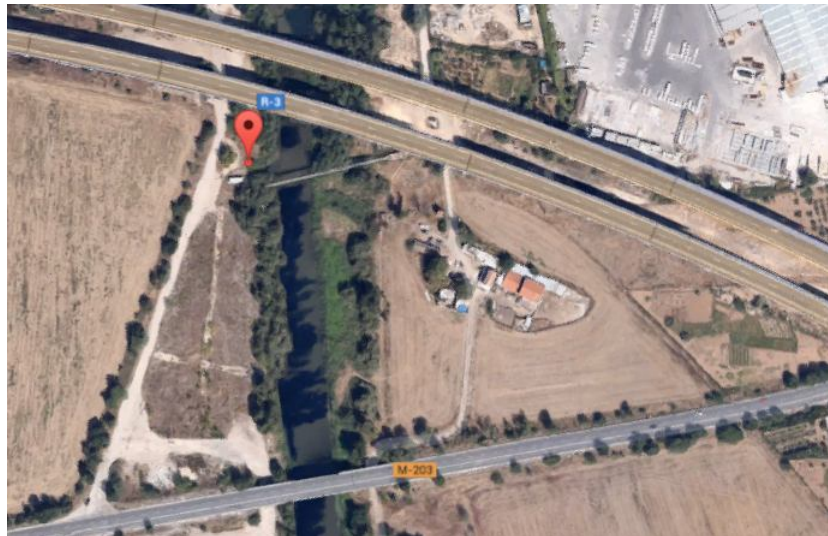


Figura 2-14. Puntos de muestreo para **a)** Río Manzanares; **b)** Río Jarama.

2.10.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME / CG / MS.

La toma de muestras de orina se realizó en frascos de plástico estériles de 250 mL disponibles en farmacia. Las muestras fueron obtenidas de 35 mujeres voluntarias en estado de gestación entre 1-8 meses, la muestra de orina obtenida fue la primera de la mañana. Posteriormente, 2 mL de cada muestra de orina se transfieren a un vial de 20 mL con una micropipeta y se almacena a -20°C, antes de realizar cada análisis la muestra se descongela a temperatura ambiente y se le adicionan 1 µL de hidróxido de sodio, solución al 30% w/v y se mezcla con la ayuda de un Vortex a 10 Hertz (Uniequip, España) durante 5 segundos.

2.11. Características analíticas de los métodos.

2.11.1. Linealidad.

Se construyeron rectas de calibrado utilizando patrones de diferentes niveles de concentración, por triplicado, representándose las áreas de los picos integrados de cada compuesto frente a la concentración del mismo. Los resultados se ajustaron por regresión lineal aplicando el método de los mínimos cuadrados. Las concentraciones de PAHs en las muestras de agua fueron determinadas por interpolación en los respectivos gráficos de calibración de los PAHs.

2.11.1.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.

Para obtener las rectas de calibrado se tomaron 100 mL de agua Milli-Q se enriquecieron con 100, 250, 100, 500 y 1000 μL de la mezcla estándar de PAHs, obteniendo niveles de concentración en el margen de 0,20 a 100,00 $\mu\text{g}/\text{L}$. Para la construcción de las rectas se empleó el método optimizado de la extracción dinámica y los procedimientos de HPLC descritos anteriormente.

2.11.1.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

Para determinar la linealidad el método, se construyeron rectas de calibrado tomando 100 mL de agua Milli-Q enriquecida con 20, 50, 100, 150 y 200 μL de la mezcla estándar de PAHs, obteniendo niveles de concentración en el margen de 0,40 a 169,2 $\mu\text{g}/\text{L}$. Para la construcción de las rectas se empleó el método optimizado de la nueva interfase y los procedimientos de HPLC descritos anteriormente.

2.11.2. Estudios de precisión.

Para evaluar la repetitividad se analizaron tres muestras el mismo día de forma consecutiva de agua milli-Q fortificadas con 100 μL de la disolución de

PAHs; para evaluar la reproducibilidad se realizaron 3 análisis de la muestra por día durante tres días distintos. Las precisiones estimadas se dan en términos de porcentaje de desviación estándar relativa (RSD %).

2.11.3. Límites de detección y cuantificación.

El límite de detección (LOD) se calculó de acuerdo al criterio de Miller [206], el cual define el límite de detección como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_B .

Del mismo modo, el límite de cuantificación (LOQ) se calculó como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco, y_B , más diez veces la desviación estándar del blanco, S_B [206].

2.11.4. Estudios de Exactitud.

Para calcular el porcentaje de recuperación del método se realizaron 6 medidas a tres niveles de concentración correspondientes al primer punto, al punto medio y al punto superior de la recta de calibración del método.

2.11.5. Comparación del método propuesto con el método de referencia.

Para determinar la validez de nuestro método, los datos obtenidos fueron contrastados con los conseguidos al aplicar el método de referencia EPA 550.1, para ello se verificó mediante el test F , concluyendo que los dos métodos no presentan desviaciones estándar significativamente diferentes al nivel de confianza del 95%, por lo cual es apropiado aplicar la prueba t - Student como criterio de aceptación del nuevo método [206] (ecuaciones 2-3, 2-4, 2-5).

$$F = \frac{s_{(y/x)1}^2}{s_{(y/x)2}^2} \quad \text{Ecuación 2-1}$$

Donde, $s_{(y/x)1}^2 > s_{(y/x)2}^2$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 2-2}$$

Donde s se calcula a partir de

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Ecuación 2-3}$$

y t tiene $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción dinámica HPLC / SPME.

3.1.1. Optimización de los parámetros cromatográficos.

Se ha utilizado la columna Envirosep PP (125 x 4.6 mm), la cual mostró ser adecuada para la separación de los PAHs analizados. Las variables cromatográficas estudiadas fueron las siguientes: gradiente de la fase móvil, caudal, temperatura de la columna cromatográfica y programa de longitudes de onda de excitación/emisión para la detección de los PAHs.

3.1.1.1. Gradiente de la fase móvil.

Las fases móviles más utilizadas para la separación cromatográfica de los PAHs son el metanol/Agua y Acetonitrilo/Agua según se observa en la bibliografía. Se ha seleccionado como fase móvil la mezcla de acetonitrilo/agua, con la se obtuvo una mejor resolución cromatográfica en conjunto con la columna mencionada anteriormente. Se probaron diferentes gradientes en la separación de los PAHs (figura 2-3).

3.1.1.2. Caudal de la fase móvil

Por otra parte se realizaron varios experimentos modificando el flujo de la fase móvil en el intervalo de 0,8 – 1,5 mL· min⁻¹. Se elige como óptimo un

flujo de 1 mL/min para el cual la presión de la columna no es demasiado elevada; (1500psi) y el tiempo de análisis es del orden de los 40 min.

3.1.1.3. Temperatura de la columna cromatográfica.

Este parámetro es importante para evitar fluctuaciones en el tiempo de retención lo que dificulta la detección debido a que el detector de fluorescencia trabaja con longitudes de onda seleccionadas que se ajustan al tiempo de retención de cada PAH. Se ha estudiado la influencia de la temperatura de la columna cromatografía en la separación de los analitos, termostaticado la columna en un rango de temperaturas comprendidas entre los 20 y 40 °C, escogiendo como temperatura óptima 35°C en la cual se observó una mejor separación y resolución de los analitos.

3.1.1.4. Detección de los PAHs.

La detección de los PAHs se llevó a cabo utilizando un detector de fluorescencia que tiene como características importantes su alta sensibilidad y selectividad con analitos capaces de dar fluorescencia como lo son la mayoría de los PAHs.

Para la optimización de la detección de fluorescencia se ajustaron las longitudes de onda de *ex/em* para cada PAH; para este fin, primero se han determinado las longitudes de excitación óptimas para cada PAH, para lo cual se realizó una inyección de 20 μ L de la mezcla estándar de los PAHs manteniendo fija a 425 nm la emisión y variable la excitación; para obtener las longitudes de emisión óptimas para cada PAH se aplicó el mismo procedimiento pero manteniendo fija la excitación a 254 nm; a partir de los espectros bidimensionales obtenidos se obtienen las longitudes de onda *ex/em* óptimas para cada PAH, las cuales se muestran en la tabla 2-2. A partir de los parámetros cromatográficos y de detección optimizados, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 3-1.

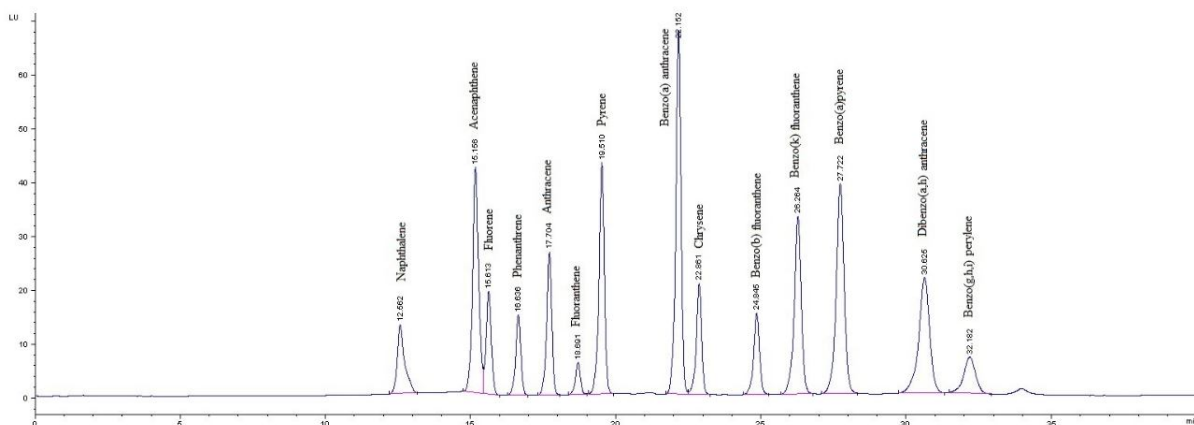


Figura 3-1. Cromatograma de los PAHs con condiciones cromatográficas optimizadas para el punto medio de la curva de calibración.

3.1.2. Proceso de extracción dinámica.

Como se ha indicado, en los análisis que involucran SPME-HPLC convencional el proceso de extracción se realiza off-line colocando la muestra en un vaso de precipitados o en un vial según el volumen de la muestra; se introduce la fibra en la muestra con agitación hasta que se alcanza el equilibrio. En el método propuesto en extracción dinámica, se alcanza el equilibrio entre la muestra y el revestimiento de la fibra mediante contacto continuado haciendo pasar la muestra a través de la cámara de extracción de la interfase a un flujo constante la muestra. Las variables estudiadas fueron, volumen de la muestra, caudal de la muestra y agitación mediante vibración de la cámara de extracción. La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente (24-26 °C). La fibra elegida para el estudio fue 85 μm Stableflex con una película de carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de Supelco, debido a que proporcionó mejores resultados entre las fibras estudiadas.

En la Figura 3-2 se observa que para 100 mL de muestra, la fibra produce una señal de saturación lo que parece indicar que se alcanza el equilibrio con la disolución.

Por lo que se refiere al caudal, el flujo de la muestra fue ajustado a 1 mL/min, debido a que para caudales superiores disminuye la señal,

probablemente debido a que no se alcance el equilibrio mencionado (véase la figura 3-3).

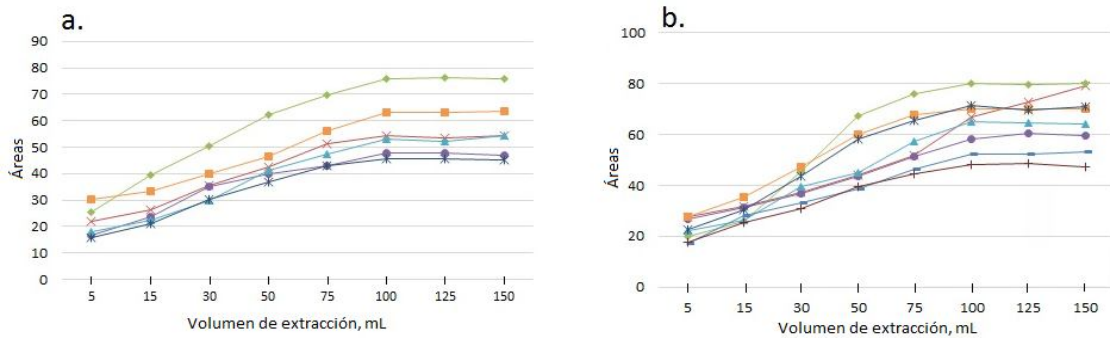


Figura 3-2. Optimización del volumen de extracción. **a.** PAHs de dos a cuatro anillos aromáticos: Naftaleno; Acenafteno; Fluoreno; Fenantreno; Antraceno; Fluoranteno. **b.** PAHs de cuatro a seis anillos aromáticos: Pireno; Benzo(a) antraceno; Criseno; Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k) fluoranteno; Benzo(a)pireno; Dibenzo(a, h) antraceno; Benzo (g, h, i) Perileno.

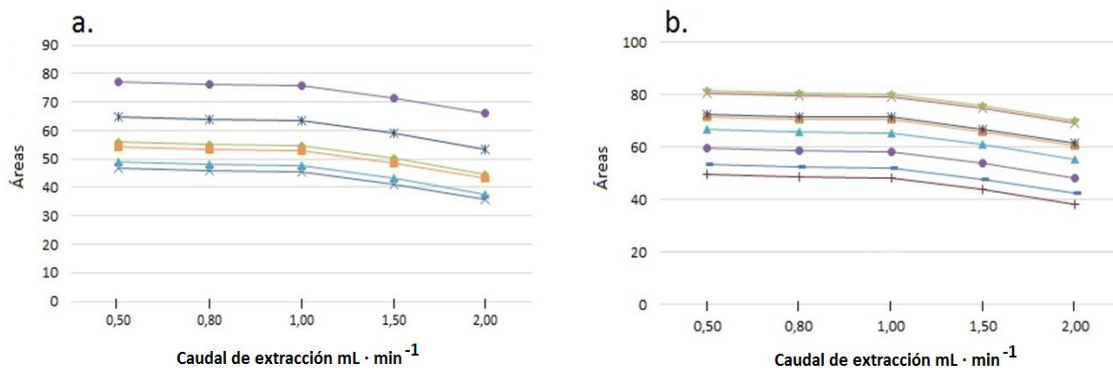


Figura 3-3. Perfiles de velocidad de extracción dinámica. **a.** PAHs de dos a cuatro anillos aromáticos: Naftaleno; Acenafteno; Fluoreno; Fenantreno; Antraceno; Fluoranteno. **b.** PAHs de cuatro a seis anillos aromáticos: Pireno; Benzo(a) antraceno; Criseno; Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k) fluoranteno; Benzo(a)pireno; Dibenzo(a, h) antraceno; Benzo (g, h, i) Perileno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a la agitación, aplicando vibración a la interfase durante la extracción, las respuestas de los analitos fueron mayores debido a que se facilita el contacto entre los analitos y el recubrimiento de fibra por mejora del transporte de los analitos desde la muestra a las proximidades de la fibra; esto produce un aumento de la sensibilidad y la reproducibilidad del método tal como se muestra en la figura 3-4.

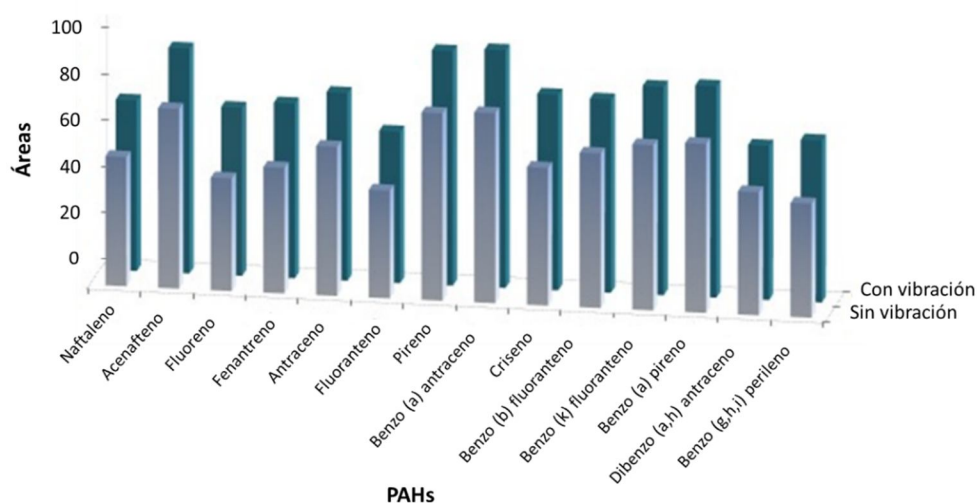


Figura 3-4. Comparación de áreas obtenidas con y sin aplicación de vibración a la cámara de desorción.

3.1.3. Proceso de Desorción

Se estudiaron los disolventes de extracción siguientes, ACN, MeOH y MeOH:ACN 50:50, v:v. Para conseguir que la desorción estática sea más eficiente, la mezcla de metanol: acetonitrilo, 50:50, v:v mostró ser la más

adecuada. El tiempo requerido para la desorción estática fue de 3 minutos; mientras que en modo dinámico, haciendo pasar fase móvil por la cámara de la fibra fue de 30 segundos. En ambos modos de desorción se aplicó vibración a la cámara de desorción SPME/HPLC.

3.1.4. Evaluación del método de SPME / HPLC.

Utilizando las condiciones optimizadas de extracción dinámica se prepararon los calibrados para los 14 PAHs estudiados empleando disoluciones de agua milli-Q enriquecidas a 5 niveles de concentración de cada uno de los PAHs con márgenes comprendidos entre 0,1 y 500,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; cada nivel de concentración del calibrado se analizó por triplicado; los resultados obtenidos fueron relacionados por el método de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Los coeficientes de regresión (r), el coeficiente de determinación (r^2), las desviaciones estándar (s), desviaciones estándar relativas (RSD%), límites de detección y de cuantificación, para el método propuesto y para el método de referencia EPA 550.1 se muestran en la tabla 3-1.

Tabla 3-1. Determinación de la linealidad para a) extracción dinámica SPME/HPLC; b) Método EPA 550.1

PAHs	a. SPME/HPLC						b. Método EPA 550.1						
	margen lineal µg/L	r	r ²	RDS % ^a	LOD ^b µg/L	r	r ²	RDS % ^a	LOD ^b µg/L	r	r ²	RDS % ^a	LOD ^b µg/L
Naftaleno	2,5 - 250,0	0,997	0,995	6,3	0,28	0,993	0,987	5,9	0,68				
Acenafteno	5,0 - 500,0	0,995	0,990	3,5	0,59	0,997	0,994	5,4	0,69				
Fluoreno	0,5 - 50,0	0,963	0,928	7,7	0,01	0,994	0,988	6,5	0,07				
Fenantreno	0,2 - 20,0	0,980	0,961	3,7	0,005	0,994	0,989	4,3	0,01				
Antraceno	0,1 - 10,0	0,994	0,989	3,5	0,007	0,995	0,991	4,1	0,006				
Fluoranteno	0,25 - 25,0	0,970	0,940	5,7	0,04	0,993	0,987	5,4	0,08				
Pireno	0,5 - 50,0	0,996	0,992	8,1	0,03	0,997	0,995	3,1	0,02				
Benzo (a) antraceno	0,25 - 25,0	0,993	0,987	6,5	0,01	0,992	0,984	4,9	0,03				
Criseno	0,25 - 25,0	0,968	0,937	5,5	0,02	0,989	0,979	10,6	0,07				
benzo (b) fluoranteno	0,1 - 10,0	0,984	0,968	5,3	0,008	0,997	0,994	5,3	0,01				
benzo (k) fluoranteno	0,1 - 10,0	0,962	0,925	3,6	0,004	0,995	0,990	7,2	0,02				
benzo (a) pireno	0,25 - 25,0	0,989	0,978	4,1	0,03	0,996	0,993	6,6	0,01				
dibenzo (a, h) antraceno	1,0 - 100,0	0,976	0,952	6,2	0,04	0,995	0,991	9,2	0,03				
benzo (g, h, i) perileno	0,4 - 40,0	0,988	0,976	3,7	0,02	0,992	0,984	7,3	0,05				

^a (n = 3) ; ^b LOD = $y_B + 3S_B$

La Exactitud fue evaluada mediante estudios de recuperación, %R, obteniendo recuperaciones entre el 59 y el 90% (tabla 3-2), los resultados obtenidos con el método propuesto se contrastaron con los del método de referencia de la EPA; para lo cual, se comprobó que no existían diferencias significativas entre los valores de las varianzas experimentales de ambos métodos, aplicando la prueba de contraste F (Ecuación 2-1). Seguidamente, se calculó la t de student (ecuación 2-2), indicando los resultados que no existen diferencias significativas a un nivel de probabilidad 95% entre las dos metodologías [206].

Para evaluar la precisión del método se estudió la repetitividad y reproducibilidad; para ello se analizó una disolución de la mezcla estándar TCL PAH No. 49156 en agua mili-Q a un nivel de concentraciones para el naftaleno 125,0 $\mu\text{g/L}$, acenaftaleno 250,0 $\mu\text{g/L}$, fluoreno 25,0 $\mu\text{g/L}$, fenantreno 10,0 $\mu\text{g/L}$, antraceno 5,0 $\mu\text{g/L}$, fluoranteno 12,5 $\mu\text{g/L}$, pireno 25,0 $\mu\text{g/L}$, benzo (a) antraceno 12,5 $\mu\text{g/L}$, criseno 12,5 $\mu\text{g/L}$, benzo (b) fluoranteno 5,0 $\mu\text{g/L}$, benzo (k) fluoranteno 5,0 $\mu\text{g/L}$, benzo (a) pireno 12,5 $\mu\text{g/L}$, dibenzo (a, h) antraceno 50,0 $\mu\text{g/L}$, benzo (g, h, i) perileno 20,0 $\mu\text{g/L}$. Para la repetitividad se estudiaron tres muestras consecutivamente el mismo día, mientras que para estudiar la reproducibilidad se realizaron tres análisis por día durante tres días. Las desviaciones estándar relativas para el método de extracción dinámica y desorción con vibración (RDS) fueron iguales o inferiores a 8,1% para $n=3$.

Con el fin de validar el método propuesto SPME, se determinó la precisión de los resultados obtenidos de las muestras de agua del pantano de San Juan con la metodología propuesta que utiliza la extracción dinámica y los encontrados por el método EPA 550.1. Al evaluar ambos métodos no se encontraron diferencias significativas para la prueba t de *student* en el nivel de significación de 0,05 para los PAHs detectados (tabla 3-3); los valores de $t_{experimental}$, obtenidos fueron inferiores al $t_{critico}$, 2,23; lo que cumple con el criterio de aceptación, por lo cual se puede afirmar que la metodología propuesta, es válida.

Tabla 3-2. Precisión y exactitud obtenidas con metodología de SPME extracción dinámica y método EPA 550.1.

PAHs	Extracción dinámica SPME/HPLC					Método EPA 550.1			t_{exp}
	$\mu\text{g/L}$	RDS % ^a	RDS % ^b	R % ^c	RDS % ^d	R % ^c	RDS % ^d	RDS % ^d	
Naftaleno	125,0	5,45	9,49	62,32	4,31	65,74	4,08	4,08	1,81
Acenafteno	250,0	6,20	10,18	65,07	5,53	61,02	5,85	5,85	1,61
Fluoreno	25,0	5,12	8,31	77,45	8,1	74,87	4,75	4,75	0,72
Fenantreno	10,0	8,90	10,09	76,80	7,7	69,58	7,93	7,93	1,79
Antraceno	5,0	3,12	5,22	66,32	3,7	69,31	4,42	4,42	1,52
Fluoranteno	12,5	5,55	4,48	81,12	8,1	81,27	7,49	7,49	0,03
Pireno	25,0	7,12	8,11	70,37	6,5	77,01	9,08	9,08	1,62
Benzo (a) antraceno	12,5	3,66	4,51	59,78	9,4	75,81	5,01	5,01	1,75
Criseno	12,5	8,01	8,75	90,02	5,5	93,70	2,40	2,40	1,35
benzo (b) fluoranteno	5,0	6,42	8,94	89,19	10,6	81,14	7,26	7,26	1,44
benzo (k) fluoranteno	5,0	4,78	6,72	76,44	6,1	76,67	9,14	9,14	0,06
benzo (a) pireno	12,5	3,15	6,33	72,44	11,2	64,74	7,26	7,26	1,66
dibenzo (a, h) antraceno	50,0	7,65	7,02	81,33	7,4	81,64	2,25	2,25	0,15
benzo (g, h, i) perileno	20,0	7,36	8,21	76,79	5,7	80,91	3,54	3,54	1,57

^a Repetitividad ($n = 3$); ^b Reproducibilidad ($n = 3$); ^c Recuperación ($n = 6$); ^d RDS % para la recuperación ($n = 6$);

$t_{critico} = 2,23$ para $P(0,05)$, grados de libertad = 10.

3.1.5. Análisis de muestras

El análisis de las muestras de aguas se llevó a cabo empleando la metodología de la EPA 550.1 y con el método que involucra la extracción dinámica; en ambos métodos se encontraron ocho PAHs en las muestras del Pantano de San Juan (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, benzo (a) antraceno, benzo (k) fluoranteno y benzo (a) pireno) de los cuales el fenantreno no fue cuantificado por encontrarse fuera del rango lineal del calibrado; mientras que en las muestras del rio Guadalix, se detectaron ocho PAHs por el método de extracción dinámica y siete por el método EPA 550.1 (naftaleno, fluoreno, fenantreno, acenafteno, criseno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno y dibenzo (a, h) antraceno); el benzo (k) fluoranteno fue detectado pero no cuantificado por el método de extracción dinámica y no fue encontrado por el método EPA; mientras que el fluoranteno fue detectado por ambos métodos pero no fue cuantificado por encontrarse fuera del rango lineal. Los resultados obtenidos en la cuantificación se encuentran en la tabla 3-3.

Tabla 3-3. Análisis de muestras de agua utilizando SPME con extracción dinámica y el método EPA 550.1.

	Pantano de San Juan					Río Guadalix				
	SPME/HPLC		Método EPA 550.1			t_{exp}	SPME/HPLC		Método EPA 550.1	
	µg/L	RDS% ^a	µg/L	RDS%	µg/L		RDS%	µg/L	RDS%	
Naftaleno	27,90	6,86	26,44	4,30	1,13	14,34	2,87	9,82	3,09	
Acenafteno	0,98	4,29	1,21	1,50	2,71	n.d.	-	n.d.	-	
Fluoreno	1,18	8,36	1,03	7,74	2,05	n.q.*	-	n.q.*	-	
Fenantreno	n.q.*	-	n.q.*	-	-	7,89	3,31	5,84	4,54	
Antraceno	n.d.	-	n.d.	-	-	1,53	2,62	1,20	5,78	
Fluoranteno	0,55	7,23	0,64	9,02	1,03	n.d.	-	n.d.	-	
Pireno	n.d.	-	n.d.	-	-	n.d.	-	n.d.	-	
Benzo (a) antraceno	1,02	8,90	0,95	7,06	1,50	n.d.	-	n.d.	-	
Criseno	n.d.	-	n.d.	-	-	0,47	4,70	0,55	3,01	
benzo (b) fluoranteno	n.d.	-	n.d.	-	-	0,31	3,31	0,17	1,94	
benzo (k) fluoranteno	0,37	12,83	0,43	10,23	0,86	n.q.*	-	n.d.	-	
benzo (a) pireno	0,86	6,87	0,72	6,25	1,97	n.d.	-	n.d.	-	
dibenzo (a, h) antraceno	n.d.	-	n.d.	-	-	0,91	5,54	2,78	6,77	
benzo (g, h, i) perileno	n.d.	-	n.d.	-	-	n.d.	-	n.d.	-	

($n = 3$); n.d. no detectado; n.q. no cuantificado; ; $t_{critico} = 2,78$ para $P(0,05)$, grados de libertad = 4.

* Los analitos fueron encontrados en las muestras de agua pero no fueron cuantificados por encontrarse fuera del rango lineal.

3.2. Desarrollo de una interfase off-line SPME con desorción térmica para HPLC.

3.2.1. Optimización de los parámetros cromatográficos.

Las variables cromatograficas optimizadas de gradiente de la fase móvil, caudal, temperatura de la columna cromatográfica y programa de longitudes de onda de excitación/emisión para la detección de los PAHs. Fueron las mismas especificadas en la sección 3.1.1. Las mismas fueron adaptadas para la optimización del método para los PAHs : Naftaleno, Acenaftaleno, Fluoreno, Fenantreno y Antraceno.

A partir de los parámetros cromatográficos y de detección optimizados, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 3-5.

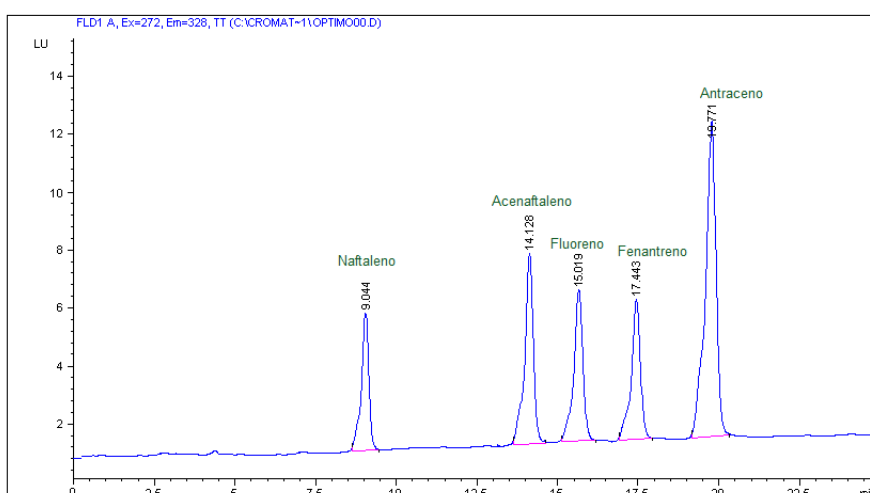


Figura 3-5. Cromatograma de los PAHs en condiciones cromatográficas optimizadas. Naftaleno 84,6 µg/L; acenaftaleno 72,7 µg/L; fluoreno 40,0 µg/L; fenantreno 13,1 µg/L y antraceno 2,4 µg/L.

3.2.2. Proceso de microextracción en fase sólida.

Las variables que afectan al proceso de extracción fueron estudiadas por inmersión de la fibra en una muestra de agua milli-Q enriquecida con una mezcla de la disolución de los PAHs. Un resumen de las variables estudiadas se muestra en la Tabla 3-4. La Figura 3-6 (a), se observa que entre las fibras ensayadas, la que produce la señal más alta de PAHs fue la CAR/PDMS StableFlex 85 μm ; esta fibra fue elegida para los estudios posteriores.

Un volumen de muestra de 50 mL fue suficiente para que se alcanzara el equilibrio entre el analito en la muestra y la adsorción del analito en la fibra como se muestra en la figura 3-6 (b), en la cual se observa un gráfico típico de saturación con volúmenes por encima al de 50 mL; el volumen seleccionado fue de 100 mL, el cual asegura que la extracción es reproducible. En cuanto al tiempo necesario para conseguir el equilibrio entre la fibra y la muestra, fue necesario un tiempo de 90 min., por encima del cual se observan señales de saturación como se muestra en la figura 3-6 (c). Por otra parte, la transferencia de masa en la fibra fue favorecida cuando la agitación de la muestra de PAHs se hace en sentido contrario que la rotación de la fibra, como se observa en la figura 3-6 (d).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

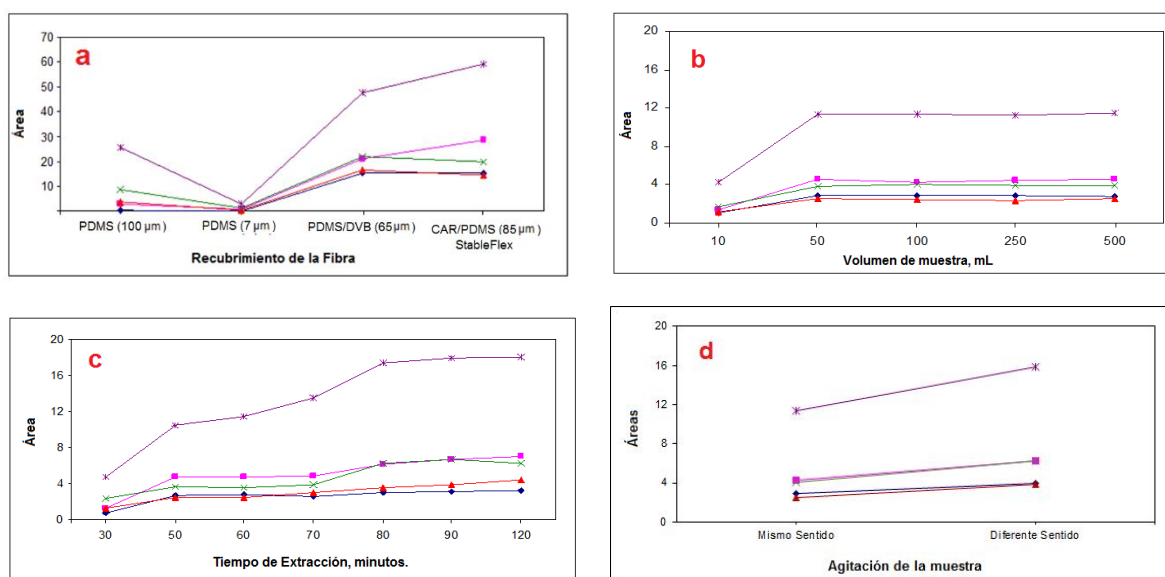


Figura 3-6. Variables que afectan el proceso de extracción SPME: **a)** Elección del recubrimiento de la fibra, **b)** Volumen de muestra, **c)** Tiempo, **d)** Agitación de la muestra. PAHs: Naftaleno —◆—, Acenafteno —■—, Fluoreno —▲—, Fenantreno —×— y Antraceno —*—. d) Tipo de agitación.

Tabla 3-4. Optimización de las variables de microextracción en fase sólida.

Variables Estudiadas	Margen	Valor seleccionado
Recubrimiento fibra	CAR/PDMS 85-μm StableFlex, PDMS/DVB 65-μm, PDMS 100-μm	CAR/PDMS StableFlex 85-μm
Volumen de muestra, mL	10, 50, 100, 250, 500	100
Tiempo de Extracción, min	30, 50, 60, 70, 80, 90, 120	90
Temperatura de Extracción, °C	4, 26	26

CAR: Carboxeno; CW: Carbowax; PDMS: PolidimetilSiloxano; DVB: Divinilbenceno.

3.2.3. Desorción térmica y recolección de los analitos en el disolvente orgánico.

Los analitos retenidos en la fibra son desorbidos térmicamente utilizando la nueva interfase y se recogen en un pequeño volumen de disolvente orgánico de acuerdo con el procedimiento especificado en la sección experimental (2.8.3.2.2). Se estudiaron los efectos de las diferentes variables involucradas en este proceso de extracción como se indica en la Tabla 3-5.

Tabla 3-5. Parámetros optimizados en el proceso de desorción.

VARIABLES ESTUDIADAS	MARGEN	VALOR SELECCIONADO
Temperatura de desorción, °C	200, 220, 240, 260, 270	270
Tiempo de desorción, min	15, 20, 25, 30, 35	30
Flujo de Argón, mL min ⁻¹	5, 7, 9, 14, 20	7
Volumen del vial colector, µL	500, 1000	500
Naturaleza del disolvente colector, %	MeOH, ACN, 50:50 MeOH:ACN, 50:50 MeOH:Water, 50:50 ACN:Water, 50:50	50:50 MeOH:ACN
Volumen del disolvente colector, µL	50, 75, 100, 150, 200	50
Temperatura del disolvente colector, °C	4, 24, 40	4
Disolvente de "barrido" (MeOH), x 10µL	2, 4, 5, 6, 7	4

3.2.3.1. Temperatura.

Como muestra la Figura 3-7 (a) la señal aumentó ligeramente en el rango de temperaturas estudiado; así, se eligió una temperatura de 270°C para obtener la señal más alta, próxima a completar la desorción.

3.2.3.2. Tiempo de desorción

En cuanto al tiempo de desorción, la forma de los perfiles parece indicar que después de alcanzar un estado estacionario aparecen pequeñas pérdidas de analitos para los tiempos de alta desorción lo cual puede ser debido a pérdidas del analito durante todo el proceso, figura 3-7 (b).

3.2.3.3. Caudal de gas de arrastre argón.

El flujo de argón en el arrastre de los analitos, figura 3-7 (c) mostró un valor óptimo para 7 mL/min, mostrando pérdidas de analitos bastante evidentes para valores mayores de flujo; esto es debido a que altos valores de flujo pueden arrastrar los analitos y llevarlos fuera del microtubo colector.

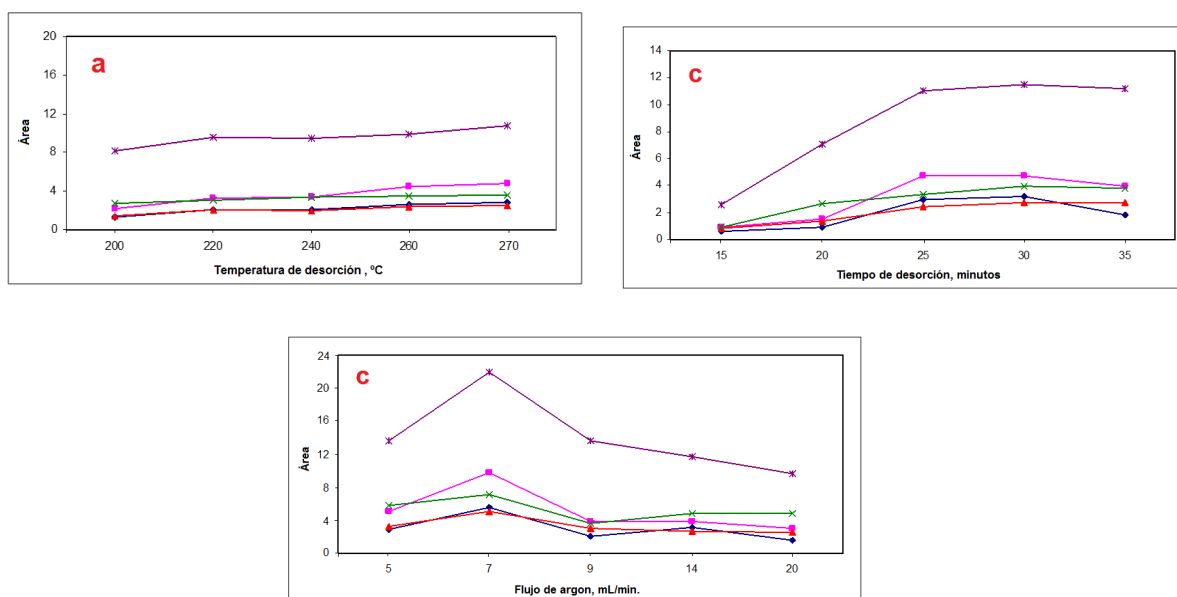


Figura 3-7. Variables que afectan el proceso de desorción: **a)** Temperatura, **b)** Tiempo de desorción, **c)** Flujo de argón (gas de arrastre). PAHs: Naftaleno —◆—, Acenafteno —■—, Fluoreno —▲—, Fenantreno —×— y Antraceno —◇—.

3.2.3.4. Forma y dimensiones del tubo colector.

En cuanto a la forma del tubo colector, los tubos pequeños y largos produjeron señales más altas porque permitían un mejor contacto entre el gas que barre los analitos y el disolvente de colección. La parte inferior de este tubo es cónica, lo cual permite una máxima transferencia de materia entre el gas de arrastre y el disolvente colector. Cuando aumenta el volumen de este tubo, las señales disminuyeron para los volúmenes por encima de 500 μ l, figura 3-8 (a).

3.2.3.5. Naturaleza del disolvente orgánico colector

La naturaleza del disolvente orgánico en la colector, figura 3-8 (b) muestra que la mezcla óptima se basa en MeOH: ACN; 1: 1; v: v; la fuerza de elución de esta mezcla es, en principio, muy alta para la inyección en HPLC, aunque en la práctica, este efecto fue pequeño en los picos cromatográficos resultantes.

3.2.3.6. Volumen del disolvente colector

El volumen del disolvente orgánico que se utiliza para recoger los analitos se optimizó; la figura 3-8 (c) muestra que la retención de los analitos en 50 μ l de disolvente colector fue la más alta. La disminución de la temperatura del disolvente también contribuye a retener los analitos debido al aumento de la constante de distribución de disolvente/gas, Figura 3-8 (d); por lo que el tubo de recogida se colocó dentro de un baño de hielo.

Por último, se optimizó el volumen de metanol utilizado para arrastrar las posibles pérdidas por condensación en el tubo de acero y asegurar que todos los analitos desorbidos lleguen al disolvente colector; los resultados se muestran en la Figura 3-8 (e).

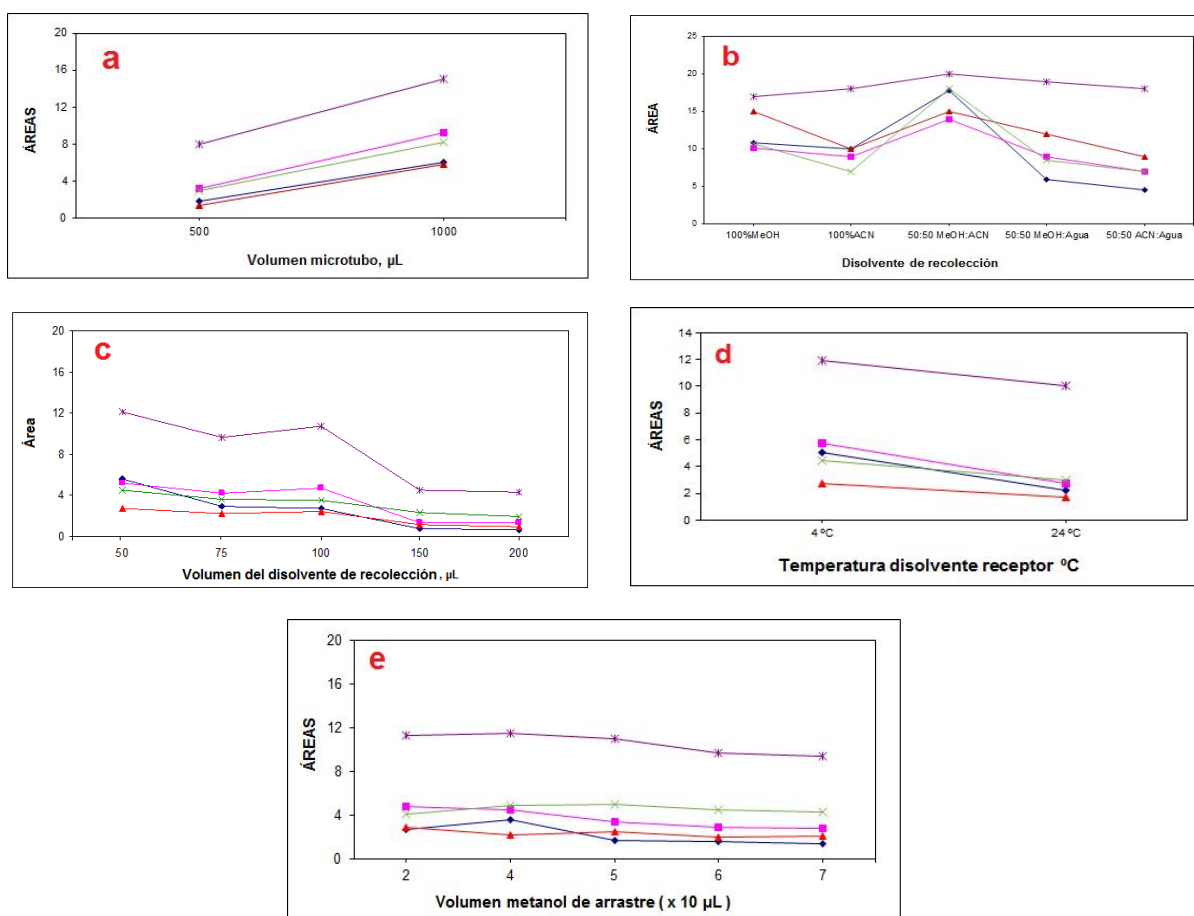


Figura 3-8. Variables que afectan el proceso de recogida de los analitos: **a)** Elección la temperatura de desorción, **b)** Tiempo de desorción, **c)** Flujo gas de arrastre. **d)** Temperatura del disolvente colector, **e)** Volumen disolvente de arrastre. PAHs: Naftaleno —◆—, Acenafteno —■—, Fluoreno —▲—, Fenantreno —×— y Antraceno —*—.

3.2.4. Evaluación SPME-HPLC Método Off-line

La linealidad del método se estudió empleando muestras de agua milli-Q con la adición de 5 niveles de concentración de las disoluciones estándar de cada uno de los PAHs en márgenes comprendidos entre 0.4 y 169.2 µg/L; cada nivel de concentración del calibrado se analizó por triplicado. Los datos de concentración de los PAHs y de respuesta del detector de fluorescencia fueron

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

relacionadas por el método de regresión lineal por mínimos cuadrados. Los coeficientes de regresión (r), el coeficiente de determinación (r^2), las desviaciones estándar (s), desviaciones estándar relativas ($RSD\%$) de cada punto, límites de detección y de cuantificación, para el método propuesto y para el método EPA 550.1 se muestran en la tabla 3-6.

Como se observa en la tabla 3-6 los límites de detección son del mismo orden para el método de la interfase SPME/HPLC, a niveles de $\mu\text{g/L}$, con lo que indica que el método propuesto es de igual sensibilidad que el de comparación para la determinación de estos contaminantes.

La precisión del método fue evaluada por medio de la repetitividad y reproducibilidad; para ello se analizó una disolución de la mezcla estándar de los cinco PAHs en agua mili-Q a niveles de concentración de $84.6 \mu\text{g/L}$ para el naftaleno; $72,7 \mu\text{g/L}$ para el acenaftaleno; $40,0 \mu\text{g/L}$ para el fluoreno; $13,1 \mu\text{g/L}$ para el fenantreno y $2,4 \mu\text{g/L}$ el antraceno. Para la determinar de la repetitividad se estudiaron tres muestras consecutivamente el mismo día, mientras que para estudiar la reproducibilidad se realizaron tres análisis por día durante tres días. Los resultados obtenidos para la metodología que utiliza SPME se muestran en la tabla 3-7; se emplearon las áreas integradas de los picos cromatográficos. Las desviaciones estándar relativas (RDS) fueron iguales o inferiores a 11% para $n=3$.

Tabla 3-6. Determinación de la linealidad para **a)** método interfase SPME/HPLC; **b)** Método EPA 550.1

PAHs	Margen lineal ($\mu\text{g/L}$)	a. Interfase SPME/HPLC					b. Método EPA 550.1				
		r	r ²	RDS % ^a	LOD ^b ($\mu\text{g/L}$)	r	r ²	RDS % ^a	LOD ^b ($\mu\text{g/L}$)		
Naftaleno	16,9 - 169,2	0,9875	0,9752	9,9	0,099	0,9896	0,9921	5,3	0,038		
Acenaftaleno	14,5 - 145,4	0,9964	0,9928	11,3	0,053	0,9947	0,9971	7,1	0,052		
Fluoreno	8,0 - 80,0	0,9913	0,9827	10,8	0,033	0,9956	0,9852	11,0	0,046		
Fenantreno	2,6 - 26,0	0,9786	0,9577	11,5	0,120	0,9970	0,9912	8,9	0,062		
Antraceno	0,4 - 4,8	0,9972	0,9945	13,1	0,071	0,9978	0,9957	9,5	0,014		

^a ($n = 3$); ^b $LOD = y_B + 3s_B$.

Con el fin de validar el método propuesto SPME, se determinó la precisión y se compararon los resultados obtenidos en el análisis de las muestras del pantano de Valdemayor aplicando la metodología de la nueva interfase SPME/HPLC con los obtenidos por el método EPA 550.1. Al evaluar ambos métodos no se encontraron diferencias significativas para la prueba *t* de *student* en el nivel de significación de 0,05 y 4 grados de libertad para los PAHs detectados (tabla 3-7); los valores de $t_{experimental}$, obtenidos fueron inferiores al $t_{critico}$, 2,78, lo que cumple con el criterio de aceptación, por lo cual se puede afirmar que la metodología propuesta, que se basa en la nueva interfase off-line que involucra una desorción térmica y la recogida de los analitos en un disolvente colector y su análisis mediante HPLC es válida.

Para validar la exactitud del método propuesto, se calculó la *t* de *student* (ecuación 2-2) obteniéndose valores de $t_{experimental}$ menores al $t_{critico}$ de 2,23 para un nivel de probabilidad del 95% y 10 grados de libertad [206]. Los resultados indican que no existen diferencias significativas a un nivel de probabilidad 95 % entre las dos metodologías (tabla 3-7).

Tabla 3-7. Precisión y exactitud obtenidas con la metodología de SPME utilizando la nueva interfase y el método EPA 550.1.

PAHs	Interfase SPME/HPLC					EPA 550.1		
	Concentración n, µg/L	RDS % ^a	RDS % ^b	R % ^c	RDS % ^d	R % ^c	RDS % ^d	t_{exp}
Naftaleno	84,6	8,8	10,1	56,0	8,2	59,9	7,7	1,19
Acenaftaleno	72,7	8,4	9,2	62,7	5,2	66,0	5,8	1,32
Fluoreno	40,0	7,3	8,0	68,6	7,0	73,0	4,8	1,48
Fenantreno	13,1	8,1	11,2	85,4	9,3	75,9	10,3	1,72
Antraceno	2,4	7,6	6,3	87,1	7,4	81,0	4,4	1,68

^a : Repetitividad (n = 3) ; ^b : Reproducibilidad (n = 3) ; ^c : Recuperación (n = 6) ; ^d : RDS % para la recuperación (n = 6).
 $t_{critico} = 2,23$ para $P(0,05)$, grados de libertad = 10.

3.2.5. Análisis de muestras de agua.

Al analizar las muestras de agua del un pantano y de un río aplicando las dos metodologías, el método EPA 550.1 y la nueva interfase, se encontraron cuatro PAHs en las muestras del Pantano de Valdemayor (acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno); mientras que en la muestra del rio Guadalix, se detectaron tres PAHs (naftaleno, fenantreno y antraceno); los resultados obtenidos en la cuantificación se encuentran en la Tabla 3-8.

Tabla 3-8. Análisis de muestras de agua utilizando la nueva interfase y el método EPA 550.1.

	Pantano de Valdemayor				Río Guadalix			
	interfase SPME		Método EPA 550.1		interfase SPME		Método EPA 550.1	
	Encontrado µg/L	RDS% ^a	Encontrado µg/L	RDS%	Encontrado µg/L	RDS%	Encontrado µg/L	RDS%
Naftaleno	n.d.	-	n.d.	-	89,9	5,8	93,4	7,4
Acenaftaleno	38,3	9,5	43,3	4,3	n.d.	-	n.d.	-
Fluoreno	50,6	6,9	57,5	5,3	n.d.	-	n.d.	-
Fenantreno	25,6	13,3	27,9	6,9	14,9	10,0	17,6	6,4
Antraceno	n.q*	-	n.q*	-	n.q*	-	n.q*	-

^a ($n = 3$); n.d.: no detectado; n.q.: no cuantificado; $t_{\text{crítico}} = 2,78$ para $P(0,05)$, grados de libertad = 4.

* Los analitos fueron encontrados en las muestras de agua pero no fueron cuantificados por encontrarse fuera del rango lineal.

3.3. Desarrollo de un sistema de muestreo SPME On-line.

3.3.1. Optimización de los parámetros Cromatográficos con disolución patrón

Para la optimización de los parámetros cromatográficos se utiliza una mezcla patrón de 54 VOC's de Supelco. En la separación de los VOC's se empleó una columna Phenomenex ZB-5MS la cual está diseñada especialmente para la separación de compuestos orgánicos volátiles. La optimización se ha realizado inyectando 1 μ L de esta mezcla en el cromatógrafo de gases, aplicando distintas rampas de temperaturas hasta conseguir las condiciones óptimas para la separación de los 54 VOC's de la mezcla patrón. Posteriormente, se ha realizado la SPME en un vial de 20 mL, en el que se depositó 1 μ L de esta mezcla. La desorción térmica de la fibra se realizó en el cromatógrafo de gases aplicando las condiciones óptimas de temperatura detalladas en el apartado 2.8.4.3 de la parte experimental que hace referencia al método de análisis y detección GC/MS. En cuanto a la detección, se ha utilizado el detector de MS empleando la librería de espectros NIST MS 2.0 con fines de identificación. En la figura 3-9, se presenta un cromatograma TIC obtenido tras extracción y desorción de la mezcla de 54 VOC's.

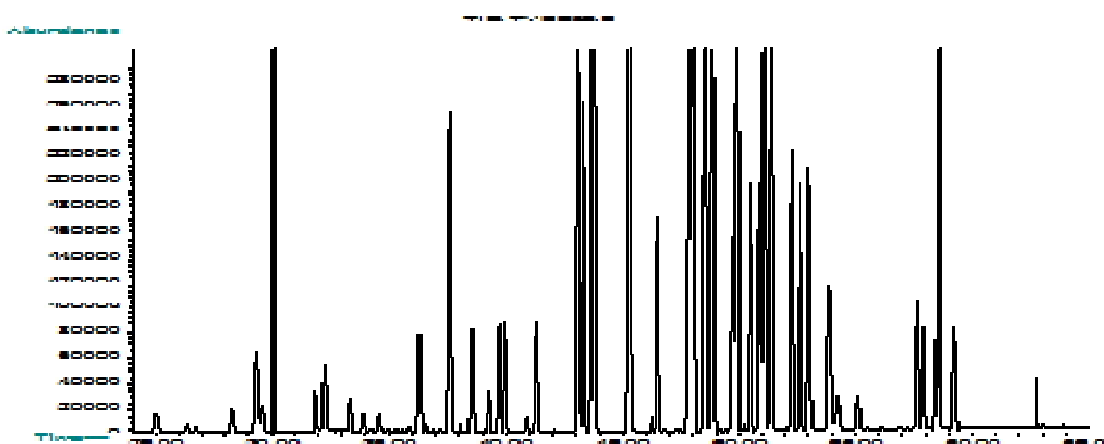


Figura 3-9. TIC obtenido mediante SPME de la mezcla de 54 VOC's.

3.3.2. Proceso de extracción

El proceso de muestreo fue optimizado primero en el laboratorio antes de realizar la extracción en los ríos; a tal fin, se diseñó un montaje experimental que simula las condiciones de caudal del efluente a muestrear; para este estudio se utilizó agua del grifo.

Antes de cada análisis, se realizó un análisis del blanco de cada fibra utilizada mediante GC/MS aplicando las condiciones óptimas para el análisis de VOC's. El primer paso para optimizar el proceso de extracción fue el análisis de un blanco del agua de grifo sumergiendo el dispositivo de SPME con las cuatro fibras; se mantuvieron las fibras expuestas en el tanque de plástico que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

contenía agua de grifo durante 1 hora y seguidamente se realizó la desorción de las fibras en el GC/MS.

Una vez obtenido el análisis del blanco del agua de grifo, se procedió a la simulación de una descarga industrial al río, para lo cual se diluyeron 20 mL de la solución "test de volátiles" en 5 L de agua; dicha disolución fue transvasada al tanque que contiene el dispositivo de muestreo SPME mediante una bomba de agua a un flujo de 300 L/h; una vez bombeada toda el agua que contiene los analitos, se apaga la bomba, dejando pasar agua de grifo a un flujo aproximado de 0,1 L/seg durante 1 hora. Pasado este tiempo las fibras fueron extraídas y analizadas aplicando el método GC/MS optimizado. El mismo estudio se realizó para una extracción durante 24 horas. En la figura 3-10 se muestra el montaje experimental para la realización de la extracción.

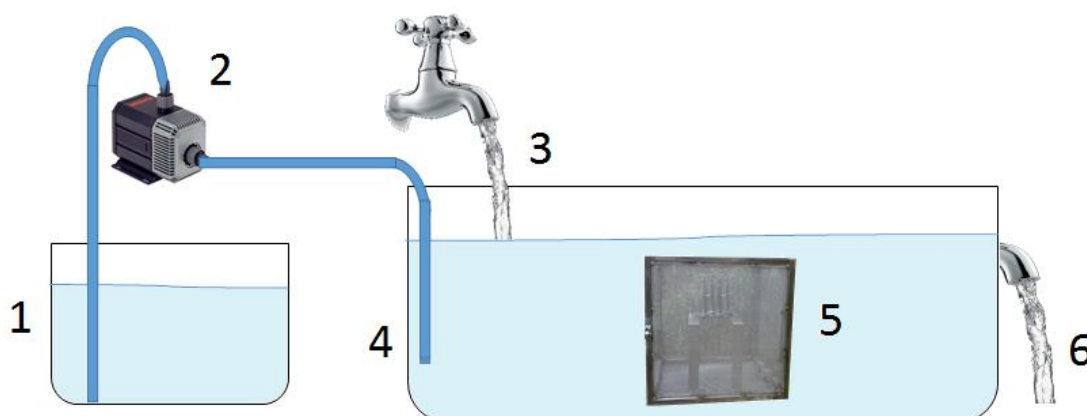


Figura 3-10. Montaje para la simulación de una descarga industrial en las aguas de un afluente. 1) Tanque de plástico que contiene 20 mL del estándar test en 5 L de agua de grifo, 2) bomba para el trasvase de la solución de los analitos, 3) agua de grifo, 4) tanque plástico de 40 L, 5) Dispositivo de muestreo SPME, 6) salida de agua.

3.3.3. Análisis de muestras de agua de río.

Una vez optimizado el proceso de extracción en el laboratorio se procedió a realizar el muestreo en los ríos Manzanares y Jarama; en ambos el dispositivo de extracción fue colocado en un punto poco caudaloso con el fin de proteger las fibras y que las condiciones fueran lo más parecidas a las del laboratorio; el caudal en este punto del río no fue medido debido a que puede variar dependiendo de las lluvias; el dispositivo de extracción fue sumergido a una profundidad de unos 30 cm y a una distancia aproximada a un metro de la orilla con el objetivo de evitar interferencias con la turbidez del agua en este punto.

3.3.3.1. Río Manzanares.

Se realizaron tres muestreos; en el primero se mantuvieron sumergidas las fibras durante 24 horas, en el segundo 3 días y en el último 1 semana. La extracción durante una semana no fue viable debido al acumulo de gran cantidad de lodo en el interior de la caja, debido a una tormenta, causando daños a dos de las cuatro fibras presentes en el dispositivo SPME. En la figura 3-11 se muestra un cromatograma de iones totales, TIC, para las fibras sumergidas durante tres días; de igual modo en la tablas 3-9, 3-10, 3-11 y 3-12 se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presentan los datos de los VOC's detectados en cada una de las cuatro fibras con un muestreo de 3 días.

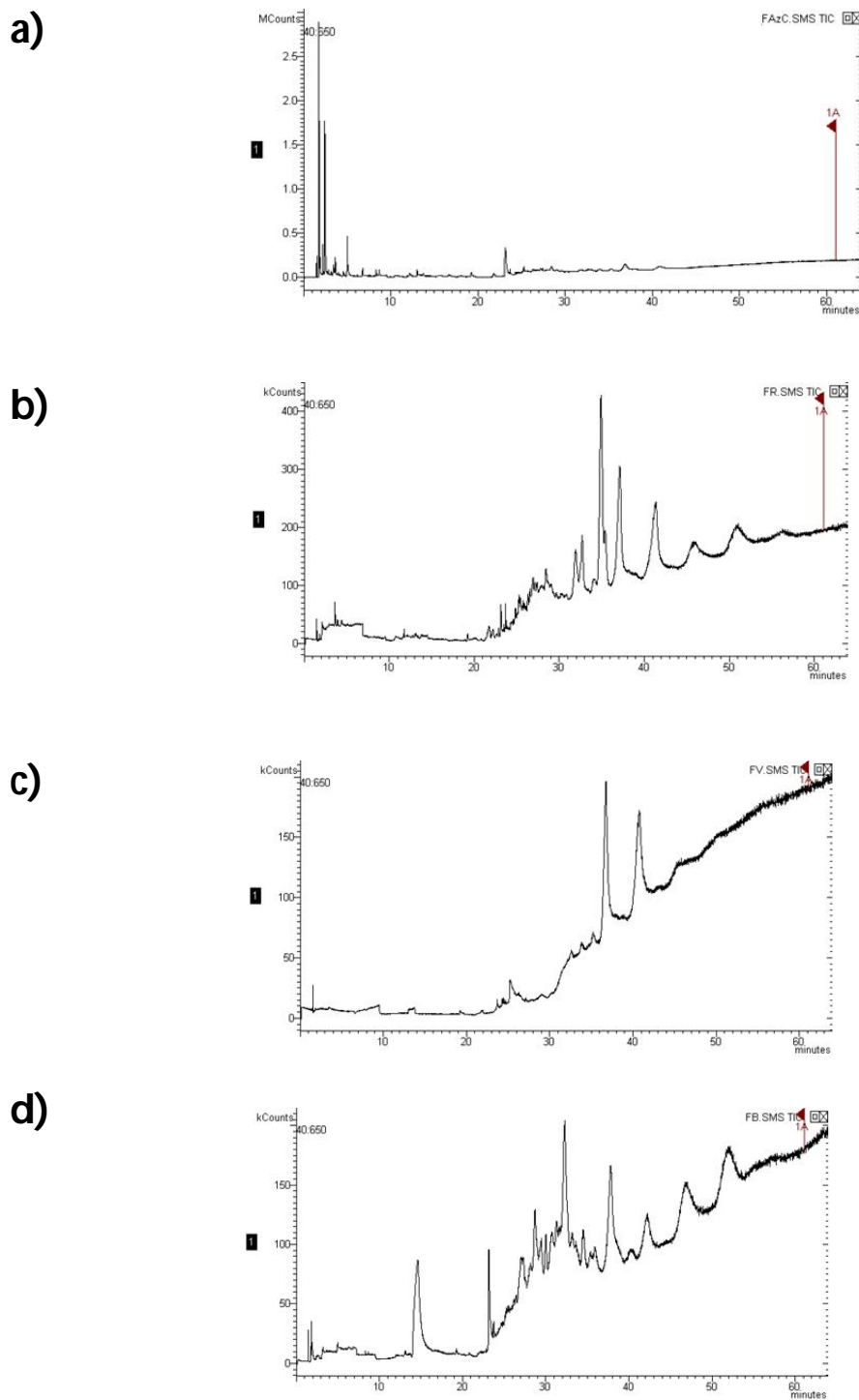


Figura 3-11. Cromatogramas de iones totales obtenidos en el río Manzanares para un muestreo de 3 días, **a)** fibra 85 μm CAR/PDMS Stableflex; **b)** fibra 100 μm PDMS; **c)** fibra 7 μm PDMS; **d)** Fibra 85 μm PA.

Tabla 3-9. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 85 µm CAR/PDMS Stableflex en el río Manzanares.

Fibra 85 µm CAR/PDMS Stableflex	
Tiempo de retención	Compuesto identificado
1,606	Desmetildoxepin
2,339	2,3 - diamo-2-cianosuccinonitrilo
2,512	1,5-Pentanediamina
3,514	Tricloroetileno
5,112	Spiro [2,4] hepta-4,6 dieno
6,847	Ácido benceno acetico, 4-methoxy-alpha-[(trimetilsilil)oxi], metil ester
8,372	Etilbenceno
11,053	Metoxi-fenil - Oxima
12,08	1-etil-3-metil Benceno,
12,193	3-cloro-1fenil-1-Propanona
12,396	1,2,3-trimetil benceno,
12,683	1-etil-3metil benceno,
13,269	1,2,4 trimetil benceno,
14,775	1 metil-4(1-metiletetil)-,(S) ciclohexano
32,217	Dotriacontano
32,653	Ácido Pentadecanoico 14-metil-, metil ester
33,956	Ácido hexadecanoico, 15-metil-, metil ester
34,815	Dotriacontano

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3-10. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 100 μm PDMS en el río Manzanares.

Fibra 100 μm PDMS	
Tiempo de retención	Compuesto identificado
1,513	fluoro- beta, 5-dihidroxi-N-metil Benzenoetanamina
12,052	1-etil-2-metil benceno
12,363	1,2,3-trimetil benceno,
13,248	1,2,3-trimetil benceno,
14,307	1,3,5-trimetil benceno
23,345	7-tetradecaceno
26,317	Nonadecano
26,459	13-Heptadecyl-1-ol
29,228	4-octadecil Morfolina,
30,937	Ciclopenta[g]-2-benzopiran, 1,3,4,6,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8,- Hexametil
35,41	Ácido n-hexadecanoico
38,831	Ácido octadecanoico, 2(2-hydroxyethoxy) etil ester

Tabla 3-11. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 7 μm PDMS en el río Manzanares.

Fibra 7 μm PDMS	
Tiempo de retención	Compuesto identificado
1,606	desmetildoxepin
2,339	2,3-diamino-2-cianosuccinitrilo
2,512	1,5, Pentanediamina
3,529	Tricloroetileno
5,099	Spiro [2,4]hepta-4,6-dieno
11,33	metoxi- fenil Oxima
32,217	Dotriacontano
32,653	Ácido Pentadecanoico, 14 metil- metil ester
33,939	Ácido hexadecanoico, 15 metil metil ester

Tabla 3-12. Resultados obtenidos de la extracción durante 3 días con la fibra de 85 μm PA en el río Manzanares.

Fibra 85 μm PA	
Tiempo de retención	Compuesto identificado
4,83	2,2- dimetoxi butano
6,01	Ciclobutilamina
6,34	,5-metil-3-nitro 2,4-hexanodiol
8,69	Etilbenceno
11,28	Ácido oxano-2-carboxilic, 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-, metil ester
12,37	Trimetil benceno
19,22	trans-2-undecen-1-ol
22,06	6-[(Z)-1-Butenil]-1,4 cicloheptadieno
23,66	Ciclo decan-ol
25,81	Dotriacontano
26,47	13-heptadecin-1-ol
26,81	Difenilmetano
35,52	Ácido n-hexadecanoico
38,78	Ácido octadecanoico

Como se observa en los resultados todas las fibras permitieron detectar compuestos, destacándose por su mayor eficiencia la de 85 μm CAR/PDMS Stableflex, con la cual se detectó un mayor número de analitos.

Una vez realizada la identificación de los analitos, se realizó una búsqueda con respecto a la procedencia de los VOC's detectados; se observa la presencia de compuestos utilizados como aditivos de la gasolina como la 4-

octadecil morfolina, nonadecano, dotriacontano; se encontraron materias primas en la fabricación de jabones y detergentes como el ácido n-hexadecanoico, ácido pentadecanoico y algunos compuestos farmacéuticos como desmetildoxepin, fenil-metoxi oxima; también se identificaron compuestos como etilbenceno ampliamente utilizado en la producción de poliestireno.

3.3.3.2. Río Jarama.

Se realizaron muestreos de retención durante 24 horas y 3 días. En las figuras 3-12, 3-13, 3-14, 3-15 se muestran los cromatogramas de iones totales para las fibras sumergidas durante tres días, de igual modo en las tablas 3-13, 3-14, 3-15, 3-16 se presentan los datos de los VOC's detectados en cada una de las cuatro fibras con un muestreo de 3 días junto con las identificaciones de algunos compuestos mediante la comparación de los espectros de masas de estos compuestos con los presentes en la librería NIST.

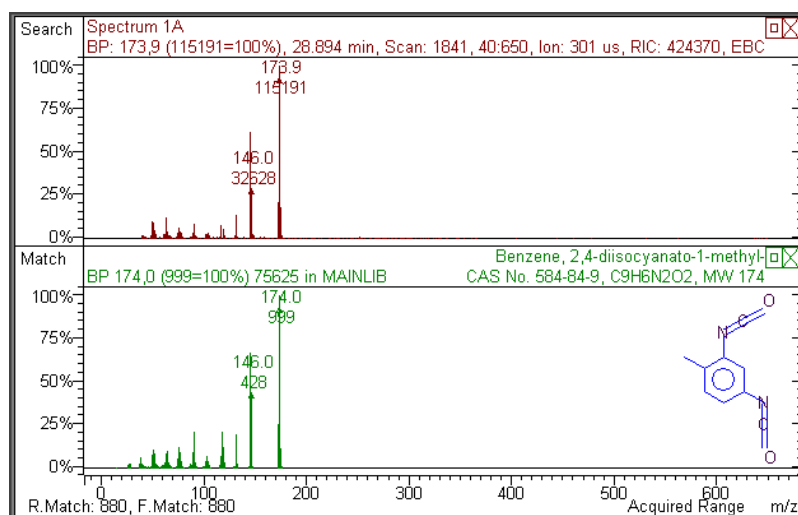
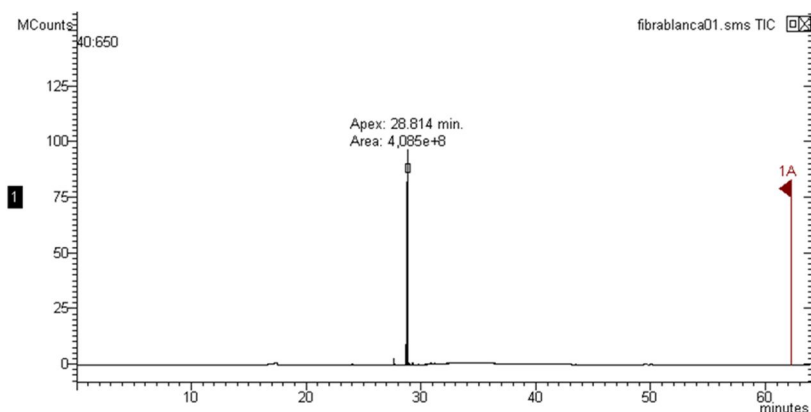


Figura 3-12. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 85 μ m PA.

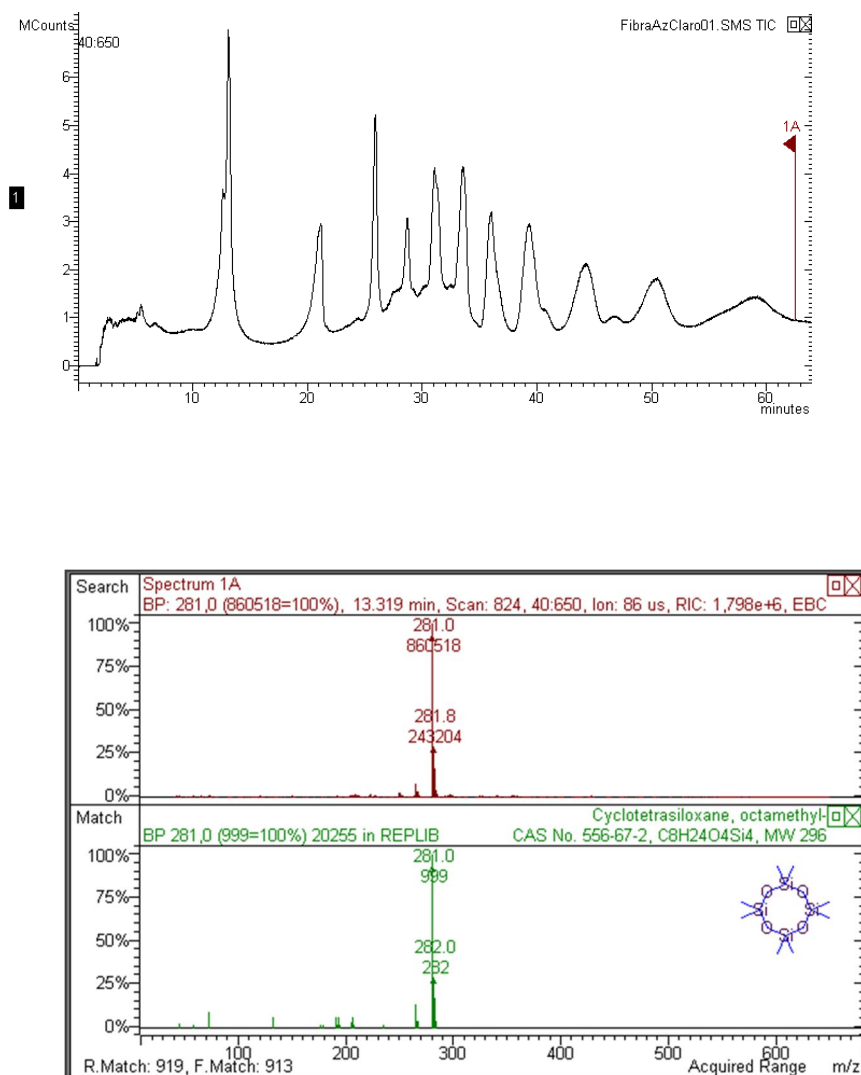


Figura 3-13. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 85 μm CAR/PDMS Stableflex.

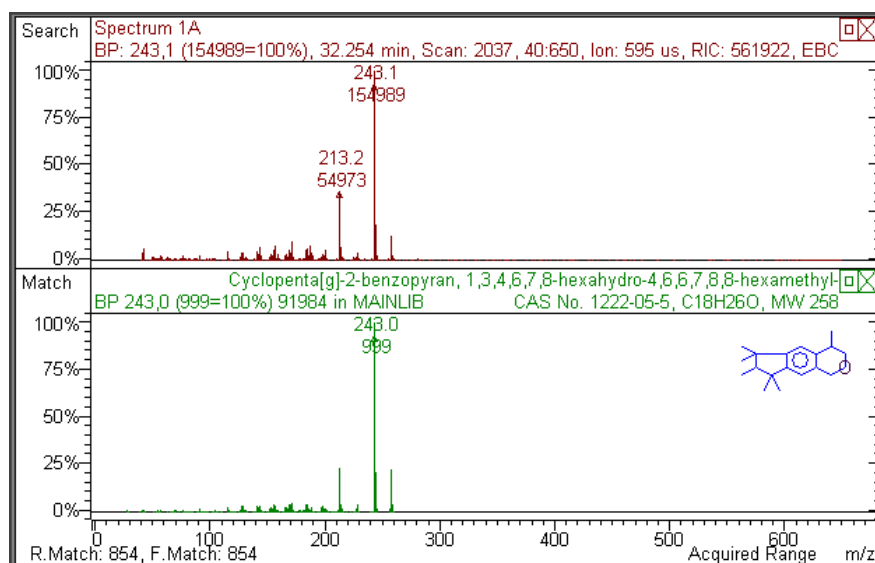
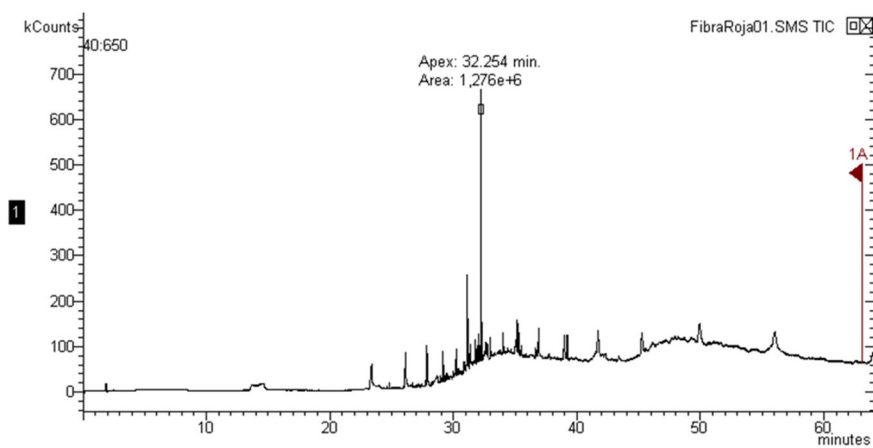


Figura 3-14. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 100 μm PDMS.

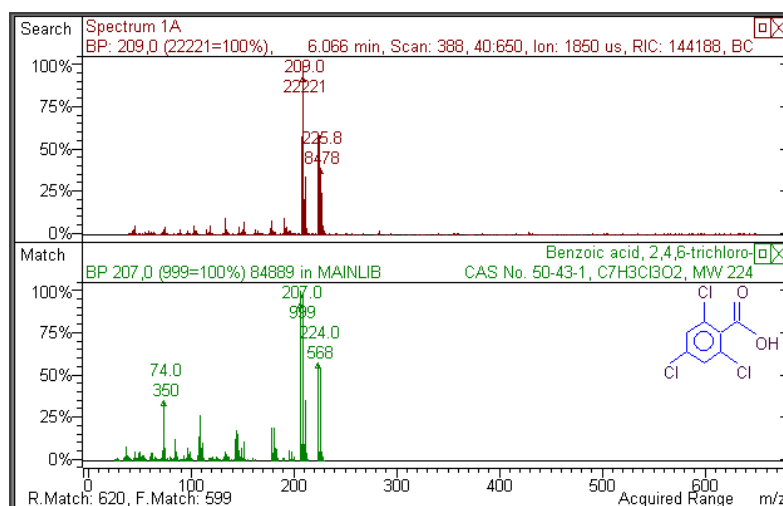
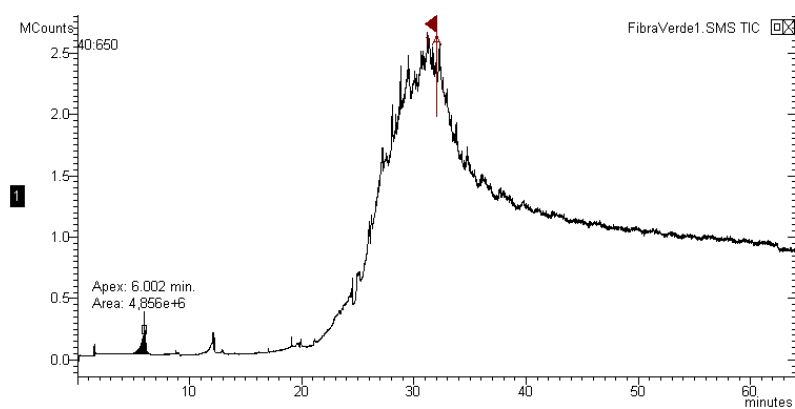


Figura 3-15. Cromatograma iónico total y espectro de masas obtenidos en el río Jarama para un muestreo de 3 días con la fibra 7 μ m PDMS.

En el caso del recubrimiento 85 μ m Poliacrílico, se detectó el compuesto 2,4 diisocianato-1-metilbenceno el cual se utiliza principalmente en la producción de poliuretano y es clasificado por la unión europea como "muy

toxico" [207]. Analizando la fibra 85 μm CAR/PDMS Stableflex, se detectó el octametilciclotetrasiloxano, para el cual no se encontró en la bibliografía una aplicación específica. Con la fibra 100 μm PDMS se detectó el ciclopenta[g]-2-benzopyran, 1,3,4,6,7,8-Hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil utilizado en fragancias y no es considerado como toxico por la unión europea [208]. Por último, para el recubrimiento de 7 μm PDMS, se detectó 2,4,6 triclorobenzoico, el cual tiene aplicaciones en la agricultura y es considerado mutagénico[209].

3.4. Determinación del sexo fetal mediante HS-SPME / CG / MS.

3.4.1. Optimización de parámetros en HS-SPME.

Se ha procedido a la optimización de los parámetros experimentales involucrados en el proceso de SPME, de forma que al final del estudio se eligen unas condiciones óptimas de trabajo basadas en los resultados obtenidos.

Con el fin de conseguir buena eficiencia, a nivel cualitativo y cuantitativo, en SPME fueron evaluados los recubrimientos de las fibras, la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y la agitación de la muestra.

Se evaluaron tiempos de extracción de 30 a 90 minutos, estableciendo como tiempo óptimo 60 minutos. Los efectos de la temperatura en la eficiencia

de la extracción fueron examinados a las temperaturas de 30, 60, 90 y 120°C. Las mejores respuestas se obtuvieron a una temperatura de extracción de 90°C. Por lo tanto, se seleccionó la temperatura de extracción 90°C como óptima.

Por lo que se refiere a la velocidad de agitación de la muestra, se estudiaron velocidades de agitación comprendidas entre 150 y 350 rpm; se observó a 250 rpm se aumentaban las respuestas de los analitos y esta velocidad no afectaba al tiempo de equilibrio, razón por la cual esta velocidad fue escogida como óptima.

Se compararon tres revestimientos de fibra de SPME (7 µm PDMS, 100 µm PDMS y 85 µm CAR/PDMS Stableflex) con los parámetros de extracción optimizados, mostrando una mejor eficiencia en la extracción de los VOC's la fibra de 85 µm CAR/PDMS Stableflex, por lo cual fue elegida para continuar con los estudios posteriores.

3.4.2. Análisis de muestras de orina.

Se analizaron por triplicado muestras de orina de madres gestantes con fetos de sexo masculino y femenino (el sexo fetal fue conocido por ecografía al obtener la muestra o posterior a su obtención) aplicando los métodos optimizados anteriormente en el apartado 2.8.5. Es bien sabido que la orina

presenta variabilidad interindividual e intraindividual [210, 211], lo que puede influir negativamente en la interpretación de los resultados e introducir sesgo adicional. Razón por lo cual comparar los cromatogramas de los análisis de muestras de orina de las madres con fetos de sexo masculinos y femeninos no se detectaron compuestos de interés potencial como marcadores; Así, se procedió a estudiar el efecto del pH en la muestra con objeto de volatilizar compuestos con propiedades ácido-base que pudieran estar disociados.

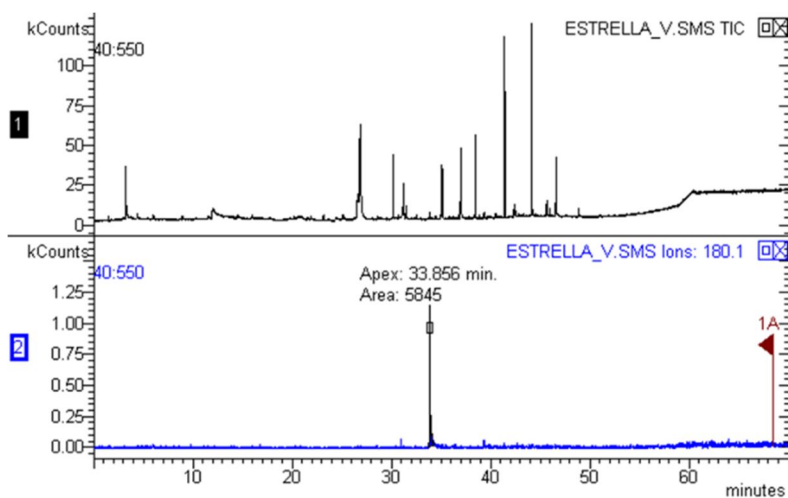
En la orina se eliminan muy diversos compuestos y debido, en muchos casos, a su mayor peso molecular y, en general, su naturaleza hidrófila tienden a ser menos volátiles [212, 213]. Por lo tanto, el pH de la muestra puede aumentar la cantidad de esos compuestos y liberar compuestos volátiles adicionales resultando en una mayor respuesta total. Por lo tanto, el pH de la orina es parámetro importante a tener en cuenta a la hora de optimizar el procedimiento de HS-SPME. Para este propósito, se realizaron pruebas adicionales modificando el pH agregando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio a las muestras de orina; también se estudió la adición de sal (NaCl). Se observó que al llevar la muestra de orina a pH básico adumento el numero de picos cromatográficos detectados y sus áreas también fueron aumentadas, por lo que se realizaron pruebas con el objetivo de optimizar el volumen de hidróxido de sodio (solución al 30% w/v); para ello se realizaron pruebas agregando 100 μL , 50 μL , 10 μL , 1 μL y 0,5 μL , a un volumen de orina de 2 mL, se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

observó que al adicionar 1 μL se obtenía igual resultado que al agregar 100 μL ; mientras que volúmenes menores a 1 μL no mejoraban la eficiencia de la extracción, por lo cual se seleccionó el volumen agregando a 1 μl de hidróxido de sodio a 2 mL de muestra de orina. Cabe destacar que condiciones básicas fuertes puede producir reacciones adicionales ya que algunos compuestos como proteínas pueden ser sensibles al pH y pueden ser degradados y desnaturalizados [214].

Una vez optimizada esta nueva metodología se realizó un estudio por comparación de los cromatogramas obtenidos del análisis de orinas de madres gestantes con fetos masculinos y femeninos encontrando un compuesto de interés a tiempo de retención de 33.8 min correspondiente al ion molecular 180.1 m/z el cual solo se encontraba en las orinas de madres con fetos masculinos como puede verse en las figuras 3-16 y 3-17.

a)



b)

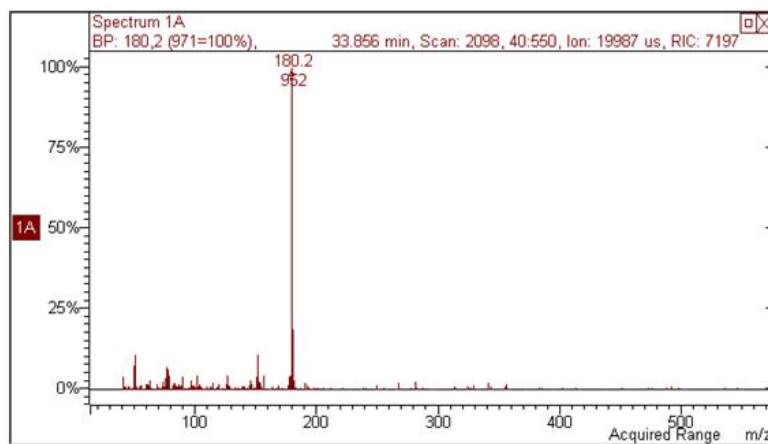
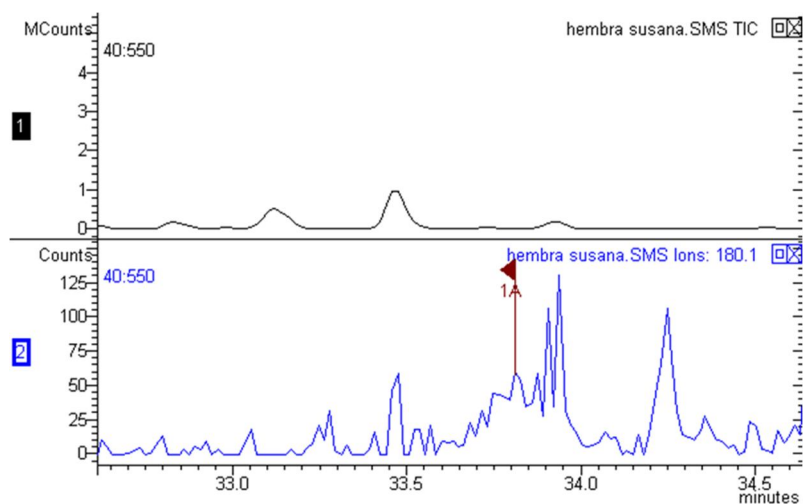


Figura 3-16. Análisis de una muestra de orina de una mujer gestante de un feto de sexo masculino. **a)** Cromatograma TIC de la muestra de orina; **b)** Espectros de masas del compuesto que aparece a 33.856 min con un ion de m/z 180.1.

a)



b)

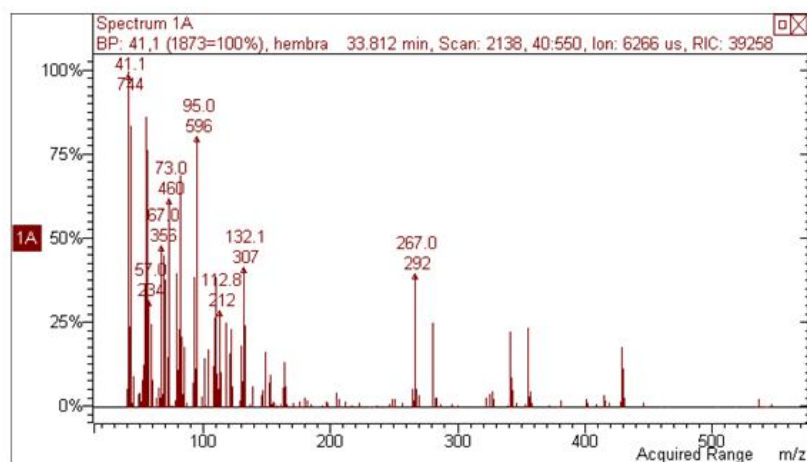


Figura 3-17. Análisis de una muestra de orina de una mujer gestante de un feto de sexo femenino. **a)** Cromatograma iónico Total TIC de la muestra de orina; **b)** Espectros de masas del compuesto que aparece a 33.856 min con un ión de m/z 180.1.

La identificación se basó en la librería espectral del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología NIST MS 2.0; esta identificación proporcionó dos

posibles identidades al compuesto detectado; la primera se identificó el compuesto con un 61.53 % de probabilidad como *trans* 2-(-2-fenil-vinil) piridina (figura 3-18 a), fórmula molecular $C_{13}H_{11}N$, peso molecular 181,23 g/ mol, CAS No. 538-49-8. En segundo lugar aparece con 4,14% de probabilidad el 9,10-dihidro-acridina (figura 3-18 b), $C_{13}H_{11}N$, peso molecular 181,23 g/ mol, CAS No. 92-81-9. No se encontró información relevante en la literatura sobre los dos posibles compuestos por lo cual no se puede relacionar directamente con el compuesto encontrado en la orina de las mujeres gestantes con feto de sexo masculino. En la figura 3-19 se muestran las identificaciones del compuesto detectado como marcado del sexo masculino del feto..

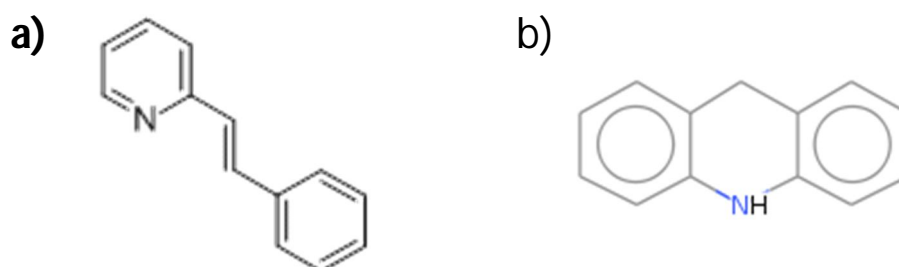


Figura 3-18. Estructura molecular de: **a)** *trans* 2-(-2-fenil-vinil) piridina; **b)** 9,10-dihidro-acridina.

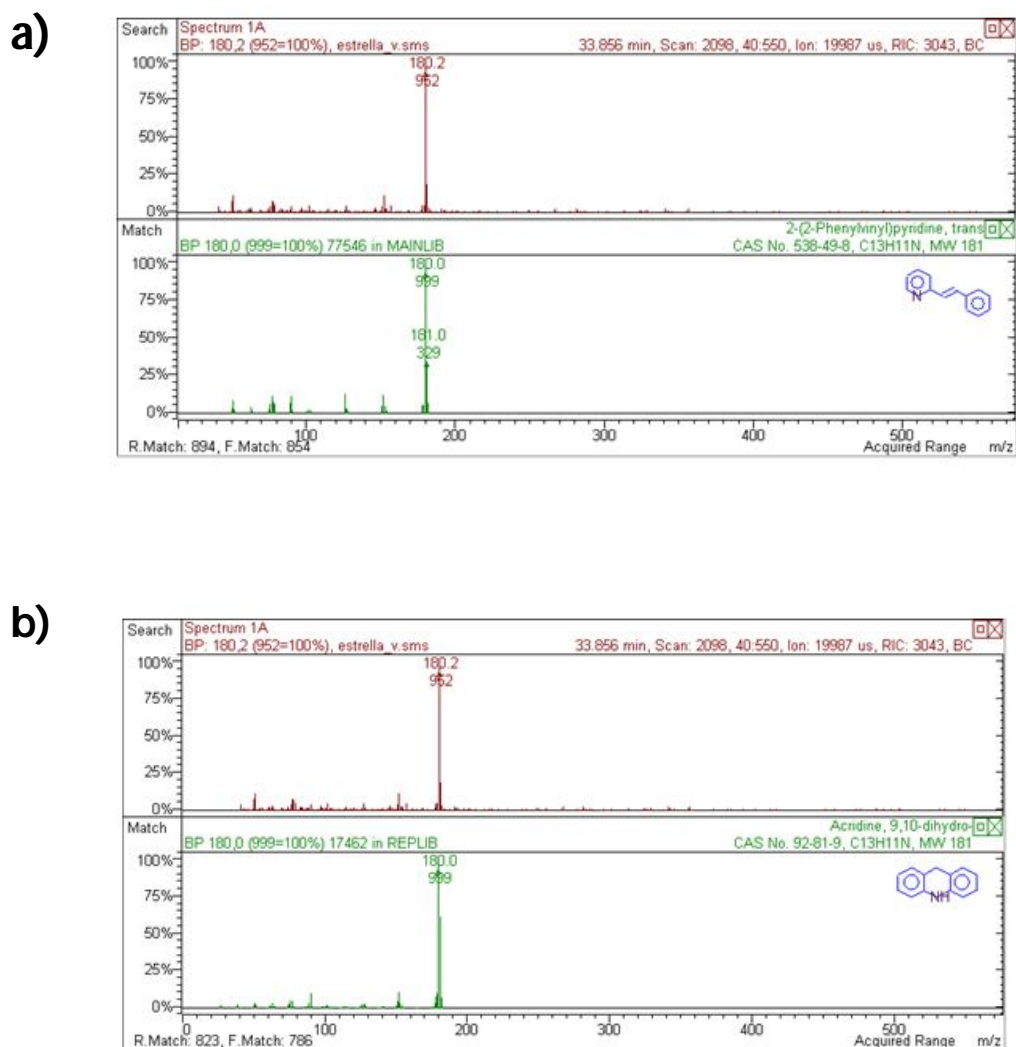


Figura 3-19. Espectro de masas de: **a)** *trans* 2-(2-fenil-vinil) piridina; **b)** 9,10-dihidro-acridina.

La presencia o ausencia del ion 180.1 m/z como marcador puede determinar si el sexo del feto si es masculino o femenino, respectivamente. Los resultados del análisis de 36 muestras de orina de mujeres gestantes se presentan en la tabla 3-13.

De las 36 muestras de orina analizadas sólo dos dieron un resultado erróneo; en un caso dando como resultado un falso positivo para feto de sexo masculino, cuando en realidad se trataba de un feto de sexo femenino, mientras que en el otro, el resultado fue de sexo fetal femenino cuando en realidad se trataba de un feto con sexo masculino; este último se dio en una mujer con un mes de gestación, por lo que se puede decir que el método no es preciso para las etapas muy iniciales de gestación. Analizando los resultados obtenidos (tabla 3-13) podemos decir que la metodología fue un 94% acertada para la determinación del sexo fetal. Todos los resultados obtenidos fueron corroborados al nacer el bebé.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3-13. Análisis de muestras de orina de mujeres en estado de gestación.

Muestra	Mes de Gestación	Sexo fetal encontrado	Sexo al momento de nacer	Resultado
Mujer 1	5	M	M	+
Mujer 2	7	M	M	+
Mujer 3	6	M	M	+
Mujer 4	5	M	M	+
Mujer 5	9	M	M	+
Mujer 6	8	M	M	+
Mujer 7	7	M	M	+
Mujer 8	8	M	M	+
Mujer 9	2	M	M	+
Mujer 10	5	M	M	+
Mujer 11	3	M	M	+
Mujer 12	7	M	M	+
Mujer 13	6	M	M	+
Mujer 14	5	M	M	+
Mujer 15	7	M	M	+
Mujer 16	4	M	M	+
Mujer 17	5	M	M	+
Mujer 18	7	M	M	+
Mujer 19	8	M	F	-
Mujer 20	5	F	F	-
Mujer 21	3	F	F	-
Mujer 22	1	F	M	-
Mujer 23	6	F	F	-
Mujer 24	6	F	F	-
Mujer 25	5	F	F	-
Mujer 26	8	F	F	-
Mujer 27	6	F	F	-
Mujer 28	8	F	F	-
Mujer 29	7	F	F	-
Mujer 30	6	F	F	-
Mujer 31	6	F	F	-
Mujer 32	2	F	F	-
Mujer 33	7	F	F	-
Mujer 34	6	F	F	-
Mujer 35	6	F	F	-
Mujer 36	6	F	F	-

4. CONCLUSIONES.

-
1. Los resultados obtenidos mostraron que la interfase modificada para realizar la extracción en modo dinámico, mostró ser una alternativa a la extracción convencional que involucra SPME/HPLC.

El método de extracción dinámica con aplicación a la interfase de vibración durante las etapas de extracción y desorción presentó una mayor precisión y exactitud que el método de referencia 550.1 de la EPA basado en SPE. La validación de la nueva metodología con los compuestos de prueba (PAHs) y la comparación de sus resultados con los obtenidos con el método EPA 550.1 no mostró diferencias significativas a un nivel de probabilidad del 95%.

2. La nueva interface SPME/HPLC de desorción térmica con recogida de los analitos desorbidos en disolvente orgánico mostró ser una alternativa a la ya existente y comercializada por Supelco. Se superó la limitación que presenta la interfase convencional SPME/HPLC, evitando el contacto de la fibra con la fase móvil a alta presión durante el proceso de desorción dinámica.

La validación de la nueva interfase analizando los compuestos de prueba (PAHs) y la comparación de sus resultados con los obtenidos con el método EPA 550.1 no mostró diferencias significativas a un nivel de

CONCLUSIONES.

probabilidad del 95%. Estos resultados ponen de manifiesto el interés potencial de esta interfase para determinar compuestos volátiles y semivolátiles en general.

3. El dispositivo diseñado para la microextracción en línea utilizando cuatro fibras permitió la detección e identificación de hasta 55 VOC's simultáneamente en aguas del río Manzanares; detectándose un mayor número de compuestos con la fibra de 85 μm CAR/PDMS Stableflex, en el río Jarama se encontraron entre otros 4 VOC's en cada recubrimiento de fibra que presentaban una señal alta los cuales fueron estudiados.

Se consiguió mantener en estado de funcionamiento las fibras sumergidas en aguas del río durante un tiempo de tres días cumpliendo con el objetivo de poder realizar un muestreo en el propio flujo para identificar posibles vertidos industriales. El objetivo de muestreo en el flujo del río durante una semana no se consiguió debido a la acumulación de arena en el interior del dispositivo de muestreo.

La cuantificación de los VOC's detectados requiere trabajo adicional, en especial por lo que se refiere a la disponibilidad de VOC's patrón.

4. La determinación temprana del sexo del feto utilizando el marcador potencial detectado en orina de mujeres gestantes es viable y fiable en un 94 % en una muestra de 36 análisis después de la semana 8 de gestación, lo que puede suponer una alternativa a la técnica de cffDNA (PCR) la cual es más costosa.

La consolidación de este marcador potencial requiere estudios más extensos; en especial, requerirá el análisis de un número de muestras de orina más representativo desde el punto de vista estadístico.

BIBLIOGRAFÍA.

-
- [1]. J. Pawliszyn. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. John Wiley & Sons Inc., Chichester, 1997.
- [2]. A. Kloskowski, M. Pilarczyk, J. Namies'nik, *Anal. Chem.*, 81 (2009), p. 7363.
- [3]. T. R. Croley, et al, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14 (2000) 1087.
- [4]. S. D. Richardson, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2719.
- [5]. M. Shimmo, T. Hyotylainen, K. Hartonen, M.L. Riekkola, *J. Microcol. Sep.*, 13 (2001) 202.
- [6]. F. Gritti, G. Felix, M.F. Achard, F. Hardouin, *Chromatographia*, 53 (2001) 201.
- [7]. P. C. Edward, Z. Weigang, T. Xenia, G. Anett, *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998), 1.
- [8]. M. J. Cugat, C. Aguilar, R. M. Marcé, F. Borrull, M. Calull, *Electrophoresis*, 23 (2002), 2279.
- [9]. F. Soxhlet, *Dinglers' Polyte.*, 232 (1879), 461.
- [10]. M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010), 2383.
- [11]. D Barceló, *J. Chromatogr.*, 643 (1993), p. 117.
- [12]. M. Olkiewicz, M. P. Caporgno, A. Fortuny, *Fuel Processing Technology* 128 (2014), 331.
- [13]. R.E Jurtoft, T.W Gouw, *Anal. Chem.*, 48 (1976), 2195.

BIBLIOGRAFIA.

- [14]. F. Augusto, L. W. Hantao, N. Mogollo'n, S. Braga, *Trends Anal. Chem.*, 43 (2013), 14.
- [15]. K. He, L. Blaney, *Journal of Hazardous Materials*, 282 (2015), 96.
- [16]. M.R. Negrão, M. de Fátima Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998), 221.
- [17]. P. Parrilla, J. L. Martínez, *Anal. Let.*, 30 (1997), 1719.
- [18]. R. J. Steen, A. C. Hogenboom, P. E. Leonards, R. A. Peerboom, W. P. Cofino, U. A. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 857 (1999), 157.
- [19]. C. Crescenzi, A. Di Corcia, G. Passariello, R. Sampieri, M.I. Turnes Carou, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996), 41.
- [20]. M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 301.
- [21]. O. Lubov, S. Mikhail, T. Grigoriy, S. Oleg, Y. Zoloto, *Anal. Chim. Acta*, 538 (2005), 35.
- [22]. N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998), 384.
- [23]. M. A. Fernández-Peralbo, C. Ferreira Vera, F. Priego-Capote, et al., *Talanta*, 126 (2014), 170.
- [24]. I. Willenberg et al., *Food Chemistry*, 166 (2015), 537.
- [25]. J. Wittsiepe, M. Nestola, M. Kohnea, P. Zinn, M. Wilhelma, *J. Chromatogr. B*, 945–946 (2014), 217.
- [26]. R.E. Jurtoft, T.W. Gouw, *Anal. Chem.*, 48 (1976), 2195.
- [27]. Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995), 34.
- [28]. Z. Zhang, M.I. Yang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994), 17.

-
- [29]. M. F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000), 3.
- [30]. D. R. Reyes, D. Iossofidis, P.A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 2623.
- [31]. L.B. Abdulra'uf, G.H. Tan, *Food Chemistry* 177 (2015), 267.
- [32]. H. Kataoka, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010), 339.
- [33]. D. Benanou, F. Acobas, M.R.d. Roubin, F. David, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003), 69.
- [34]. T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *Anal. Chim. Acta*, 614 (2008), 27.
- [35]. C. Basheer, M. Vetrichelvan, S. Valiyaveetil, H.K. Lee, *J. Chromatogr., A*, 1139 (2007), 157.
- [36]. I. Y. Eom, A. M. Tugulea, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 1196–1197 (2008), 3.
- [37]. M. Mieth, S. Kischkel, J.K. Schubert, D. Hein, W. Miekisch, *Anal. Chem.*, 81 (2009), 5851.
- [39]. M. Abdel-Rehim, *LC-GC Eur.*, 22 (2009), 8.
- [40]. M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr., A*, 1217 (2010), 2569.
- [41]. B. J. Gonçalves Silvaa, F. Mauro Lançasb, M. E. Costa Queiroz, *J. Chromatogr. B* 862 (2008), 181.
- [42]. H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000), 153.
- [43]. C. Duan, Z. Shen, D. Wu, Y. Guan, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011), 1568.
- [44]. C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 62 (1990), 2145.

BIBLIOGRAFIA.

- [45]. J. Koziel, M. Jia, A. Khaled, J. Noé, J. Pawliszyn, *Analytica Chimica Acta*, 400 (1999), 153.
- [46]. A. Khaled, J. Pawliszyn, *Analytica Chimica Acta*, 400 (1999), 153.
- [47]. R. Maiaa, M. Correiaa, I. M. Brás Pereira, V. M. Belezac, *Microchemical Journal*, 112 (2014), 164.
- [48]. J. Merib, V. Simão, A. Neves Dias, E. Carasek, / *J. Chromatogr. A*, 1321 (2013), 30.
- [49]. K. Gorynskia, B. Bojkoa, M. Klugerc, A. Jerathc, M. Wąsowicz, J. Pawliszyn, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 92 (2014), 183.
- [50]. L. Gaoa, J. Liua, C. Wanga, G. Liub, X. Niua, C. Shua, J. Zhua, *J. Chromatogr. B*, 944 (2014), 136.
- [51]. M. Hippelein, *Chemosphere*, 65 (2006), 271.
- [52]. I. Špánika, A. Pažitnáa, P. Šiškab, P. Szolcsányib, *Food Chemistry*, 158 (2014), 497.
- [53]. M. Monteiroa, M. Carvalhoa, R. Henriquéc, C. Jerónimoc, et al., *European Journal of Cancer*, 50 (2014), 1993.
- [54]. K. E. Pickla, V. Adamekb, R. Gorgesb, F. M. Sinner, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (2011), 1231.
- [55]. G. Vas, K. Vekey, *J. Mass Spectrom.*, 39 (2004), 233.
- [56]. T. Gorecki, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996), 3008.

-
- [57]. H. Kataoka, K. Saito, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (2011), 926.
- [58]. Z. Cui, K. Zhang, Q. Zhou, J. Liu, G. Jiang, *Talanta*, 85 (2011), 1028.
- [59]. R. I. Bonansea, M. V. Améa, D. A. Wunderlin, *Chemosphere*, 90 (2013), 1860.
- [60]. F. Tassia, F. Capecchiaccia, A. Bucciantia, O. Vaselli, *Applied Geochemistry*, 27 (2012), 115.
- [61]. P. Toscano, B. Giolia, S. Dugherib, A. Salvinic, A. Matese, et al., *Environmental Pollution*, 159 (2011), 1174.
- [62]. D. Polia, M. Goldonia, M. Corradi, et al., *J. Chromatogr. B*, 878 (2010), 2643.
- [63]. W. Miekischa, P. Fuchsa, S. Kamysek, et al., *Clinica Chimica Acta*, 395 (2008), 32.
- [64]. J. J. Ríos Acevedo, M. N. Kayali Sayadi, L. M. Polo Díez, *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3 (2013), 219.
- [65]. H. C. Menezesa, B. Pereira Pauloa, M. J. Nunes Paiva, *Microchemical Journal*, 118 (2015), 272.
- [66]. F. Jiaa, X. Cuia, W. Wangb, L. Delgado-Morenoa, J. Gan, *Environmental Pollution*, 167 (2012), 34.
- [67]. H. Chenga, J. Chena, X. Li, et al., *Postharvest Biology and Technology*, 100 (2015), 59.
- [68]. Z. Cui, K. Zhang, Q. Zhou, J. Liu, *Talanta*, 85 (2011), 1028.

BIBLIOGRAFIA.

- [69]. O. Mastrogiannia, G. Theodoridis, K. Spagou, et al., *Forensic Science International*, 215 (2012), 105.
- [70]. F. M. Musteata, J. Pawliszyn, *J. Biochem. Biophys. Métodos*, 70 (2007), 181.
- [71]. F.M. Musteata, J. Pawliszyn, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007), 36.
- [72]. D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010), 4041.
- [73]. D. Vuckovic, E. Cudjoe, FM Musteata, J. Pawliszyn, *Nat. Protoc.*, 5 (2010), 140.
- [74]. J. Y. Liu, G. B. Yiang, Q. F. Zhou, K. W. Yang, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001), 459.
- [75]. S. Fustinoni S., R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, *J. Chromatogr. B*, 817 (2005), 309.
- [76]. S. Ulrich, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000), 167.
- [77]. F. M. Musteata, J. Pawliszyn, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007), 181.
- [78]. F. M. Musteata, J. Pawliszyn, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007), 36.
- [79]. D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010), 4041.
- [80]. D. Vuckovic, E. Cudjoe, F.M. Musteata, J. Pawliszyn, *Nat. Protoc.*, 5 (2010), 140.
- [81]. F. M. Musteata, I. de Lannoy, B. Gien, J. Pawliszyn, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47 (2008), 907.
- [82]. D. Louch; S. Motlagh; J. Pawliszyn. *J. Anal. Chem.*, 64 (1992), 1187.
- [83]. Z. Zhang; J. Pawliszyn. *J. Anal. Chem.*, 65 (1993), 1843.

-
- [84]. J. Ai. Anal. Chem., 69 (1997), 1230.
- [85]. J. Ai. Anal. Chem., 69 (1997), 3260.
- [86]. J. Ai. Anal. Chem., 70 (1998), 4822.
- [87]. T. Górecki; X. Yu; J. Pawliszyn. Analyst, 124 (1999), 643.
- [88]. S. Ulrich, Journal of Chromatography A, 902 (2000), 167.
- [89]. A. L. P. Valente; F. Augusto. Química Nova, 23 (4), (2000), 523.
- [90]. J. Pawliszyn, Journal of Chromatographic Science, 38 (2000), 270.
- [91]. Z. Mester, R. Sturgeon, J. Pawliszyn. Spectrochimica Acta Part B, 56 (2001), 233.
- [92]. R. J. Bartelt, B. W. Zilkowski, Anal. Chem., 71 (1999), 92.
- [93]. A. L. Nguyen, J.H.T. Luong, Anal. Chem., 69 (1997), 1726.
- [94]. J. J. Langenfeld, S. B. Hawthorne, DJ Miller, Anal. Chem., 68 (1996), 144.
- [95]. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H-G. Janssen, C. Cramers, Anal. Chem., 71 (1999), 5213.
- [96]. W. H. Vaes, P. Mayer, A. G. Oomen, J. L. Hermens, J. Tolls, Anal. Chem., 72 (2000), 639.
- [97]. W. H. Vaes, C. Hamwijk, E. Urresterazu Ramos, H.J.M. Verhaar, J. L. Hermens, Anal. Chem., 68 (1996), 4458.
- [98]. T. Gorecki, X. M. Xu, J. Pawliszyn, Analyst, 124 (1999), 643.
- [99]. M. Constant, J. Collier, J. Am. Soc. Brew. Chem., 55 (1997), 112.
- [100]. E. A. Souza Silva, S. Risticovic, Janusz Pawliszyn, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 43 (2013), 24.

BIBLIOGRAFIA.

- [101]. P. Popp, A. Paschke, *Chromatographia*, 49 (1999), 686.
- [102]. X. R. Xia, R. B. Leidy, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 2041.
- [103]. J. Wu, X. Yu, H. Lord, J. Pawliszyn, *Analyst*, 125 (2000), 391.
- [104]. E. H. Koster, C. Crescenzi, W. den Hoedt, K. Ensing, G.J. de Jong, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 3140.
- [105]. T. P. Gbatu, K. L. Sutton, J. A. Caruso, *Anal. Chem. Acta*, 402 (1999), 67.
- [106]. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H-G. Janssen, C. Cramers, *Anal. Chem.*, 71 (1999), 5213.
- [107]. S. Díez, J.M. Bayona, *Talanta*, 77 (2008), 21–27.
- [108]. J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*. Ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- [109]. Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casais, M.C. *Técnicas de Separación en Química Analítica*, Ed. Síntesis, 2002.
- [110]. X. Cheng, J. Forsythe, E. Peterkin, *Water Research*, 47, (2013), 2331.
- [111]. H. Posen; L. Zupančič-Kralj. *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999), 272.
- [112]. S. Urich. *J. Chromatogr. A*, 902 (2000), 167.
- [113]. A. Peñalver; E. Pocurull; F. Borull; M.R. Marcé. *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999), 557-568.
- [114]. R. Eisert, J. Pawliszyn, *Critical Rev, Anal. Chem.*, 27 (1997), 103.
- [115]. N. R. Negrao, M. F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998), 211.
- [116]. M.N. Sarrión, F. J. Santos, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A*, 947 (2002), 155.

-
- [117]. J. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995), 2530.
- [118]. V. López-Ávila, *Critical Rev. Anal. Chem.*, 29 (1999), 195.
- [119]. Y. Chen, L. M. Sidisky, *Analytica Chimica Acta*, 817 (2014), 23.
- [120]. Z. Liu, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatographic Science*, 44 (2006), 366.
- [121]. J. Deng, Y. Yang, X. Wang, T. Luan, *Trends in Analytical Chemistry*, 55 (2014) 55.
- [122]. R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999), 648.
- [123]. H.H. Jelen, A. Ziolkowska, A. Kaczmarek, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010), 12585.
- [124]. C. Bicchi, M.R. Ruosi, C. Cagliero, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011), 753.
- [125]. E. Liberto, M.R. Ruosi, C. Cordero, P. Rubiolo, C. Bicchi, B. Sgorbini, *J. Agric. Food. Chem.*, 61 (2013), 1652.
- [126]. Z. Mester, J. Lam, R. Sturgeon, J. Pawliszyn, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000), 837.
- [127]. Z. Mester, R.E. Sturgeon, J.W. Lam, P.S. Maxwell, L. Péter, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16 (2001), 1313.
- [128]. C. Dietz, T. Pérez-Corona, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003), 467.
- [129]. F. Zheng, B. Hu, *Talanta*, 85 (2011), 1166.
- [130]. C.H. Teng, Y.C. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003), 1092.

BIBLIOGRAFIA.

- [131]. S. Perera, A. Berthod, E. Dodbiba, D.W. Armstrong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26 (2012), 853.
- [132]. H. Tong, N. Sze, B. Thomson, S. Nacson, J. Pawliszyn, *Analyst*, 127 (2002), 1207.
- [133]. Y. Wang, M. Walles, B. Thomson, S. Nacson, J. Pawliszyn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (2004), 157.
- [134]. Y. Wang, B.B. Schneider, T.R. Covey, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 77 (2005), 8095.
- [135]. M. Möder, H. Löster, R. Herzsuh, P. Popp, *J. Mass Spectrom.*, 32 (1997), 1195.
- [136]. M.A. McCooye, Z. Mester, B. Eills, D.A. Barnett, R.W. Purves, R. Guevremont, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 3071.
- [137]. M. W. J. van Hout, V. Jas, H.A.G. Niederländer, R.A. de Zeeuw, G.J. de Jong, *Analyst*, 127 (2002), 355.
- [138]. M.W.J. van Hout, V. Jas, H.A.G. Niederländer, R.A. de Zeeuw, G.J. de Jong, *J. Sep. Sci.*, 26 (2003), 1563.
- [139]. C.P. Kuo, J. Shiea, *Anal. Chem.*, 71 (1999), 4413.
- [140]. B. Hu, P.K. So, Z.P. Yao, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 24 (2013), 57.
- [141]. Y. Yang, J. Deng, Z.P. Yao, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 25 (2014), 37.
- [142]. Z. Takats, *Science*, 306 (2004), 471.
- [143]. P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, C.L. Chenier, C.R.J. Lepage, *J. Chromatogr. A*, 1110 (2006), 86.

-
- [144]. P.A. D'Agostino, C.L. Chenier, J.R. Hancock, C.R.J. Lepage, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21 (2007), 543.
- [145]. T. Gouin, D. Mackay, K.C. Jones, T. Harner, S.N. Meijer *Environmental Pollution* 128 (2004), 139.
- [146]. M. Tobiszewski, J. Namiesnik, *Environmental Pollution* 162 (2012), 110.
- [147]. N. Guerra, V. Vale, E. Ferreira, M. Joao, C. Almeida, *Chemosphere*, 68 (2007), 501.
- [148]. M. Tankiewicz, C. Morrison, M. Biziuk, *J. Microc.* 108 (2013), 117.
- [149]. A. Menezes, F. N. Dos Santos, P. A De P. Pereira, *J. Microc.* 96 (2010), 139.
- [150]. L. Scibetta, L. Campo, R. et al. *Anal. Chimica Acta*, 581 (2007), 53.
- [151]. S. Wang, K. D. Oakes, L. M. Bragg, J. Pawliszing, G. Dixon, M. R. Servos, *Chemosphere*. 85 (2011), 1472.
- [152]. S. M. Zakir, B. Bojko, J. Pawliszyn, *Anal. Chimica Acta*. 776 (2013), 41.
- [153]. M.S. Altaki, F.J. Santos, M.T. Galceran. *J. of Chromatogr. A*. 1146 (2007), 103.
- [154]. R. J. Bryant, A. M. McClung, *Food Chem.* 124 (2011), 501.
- [155]. S. Panseri, S. Soncin, L. M. Chiesa, P. A. Biondi, *Food Chem.* 127 (2011), 886.
- [156]. Q.L. Ma, N. Hamid, A. E. D. Bekhit, J. Robertson, T.F. Law, *Microchemical Journal* 111 (2013), 16.
- [157]. R. J. Bryant, A.M. McClung, *Food Chemistry* 124 (2011), 501.
- [158]. M. Tankiewicz, C. Morrison, M. Biziuk, *Talanta* 107 (2013), 1.

BIBLIOGRAFIA.

- [159]. H. L. Lord, *J. of Chromatogr. A*, 1152 (2007), 2.
- [160]. C. G. Zambonin, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003), 73.
- [161]. E. H. M. Koster, C. Wemes, J. B. Morsink, G. J. de Jong, *J. of chromatogr. B* 39 (2000), 175.
- [162]. A. A. Boyd, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 68 (1996), 1521.
- [163]. C. M. Lock, L. Chen, D. A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999), 1744.
- [164]. H. Daimon, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.* 34 (1997), 3140.
- [165]. J. C. Rodríguez, A. J. Santos, C. Fernández et al. *J. of Chromatogr. A*. 1105 (2006), 208.
- [166]. M. J. Nieva, S. Rubio, M. J. Santos, *Analyst* 126 (2001), 1326.
- [167]. C. C. Chou, M. R. Lee, *Anal. Chim.* 538 (2005), 49.
- [168]. T. Kumazawa, H. Seno, K. Watanabe, H. Hattori et al. *Mass Spectrom.* 35 (2000), 1091.
- [169]. Keith, L.H. *Compilation of EPA's sampling and analysis methods*, 2nd ed.; 1996.
- [170]. K. Hiroyuki, *Current Pharmaceutical Analysis*, 1 (2005), 65.
- [171]. W. Zhang and C. Zlin, *Journal of Chromatography A*, 1278 (2013), 29.
- [172]. A. Bordagaray, R. García and E. Millán, *Analytical Methods*, 5 (2013), 2565.
- [173]. Gaurav, V. Kaur, A. Kumar, A. Kumar and P. K. Rai, *Journal of Hazardous Materials*, 147 (2007), 691.

-
- [174]. N. Kayali, F. G. Tamayo and L. M. Polo, *Talanta*, 69 (2006), 1095.
- [175]. H. L. Lord, *Journal of Chromatography A*, 1152 (2007), 2.
- [176]. W. W. Clark, G. Cooke, *Global Sustainable Communities Handbook*, 2 (2014), 13.
- [177]. Q. Wang, Z. Xie, F. Li, *Environmental Pollution* 206 (2015), 227.
- [178]. N. Howden, T. Burt, F. Worrall, S. Mathias, M. Whelan, *Ana. Assoc. Am. Geograph.*, 103 (2) (2013), 397.
- [179]. J. B. Ellis, D. Butler, *Science of the Total Environment* 526 (2015), 98.
- [180]. N.H. Tran, K. Yew-Hoong, H. Hao, *Science of the Total Environment* 538 (2015), 38.
- [181]. K. Holvoet, I. Sampers, M. Seynaeve, M. Uyttendaele, *International Journal of Food Microbiology* 171 (2014), 21.
- [182]. M. Son, D. Cho, J. H. Lim, et al., *Biosensors and Bioelectronics* 74 (2015), 199.
- [183]. L. J. Bao, K. A. Maruya, S. A. Snyder, E. Y. Zeng, *Environmental Pollution* 163 (2012), 100.
- [184]. X. Gong, Z. Chen, Z. Luo, *Environ. Monit. Evaluar.*, 186 (2014), 9101.
- [185]. N. Corcoll, V. Acuña, D. Barceló a et al., *Chemosphere*, 112 (2014), 185.
- [186]. M. Catalá, N. Domínguez-Moruco, A. Migens et al., *Science of the Total Environment* 520 (2015), 198.
- [187]. T. Kaczor, *Natural Medicine Journal*, 7 (91), (2015), 27.
- [188]. Carrizo, C., Berger, M, *Polis*, 13 (37), (2014), 317.

BIBLIOGRAFIA.

- [189]. S. Meagher, G. Davison, *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 8 (1996), 322-324.
- [190]. Y. M Dennis Lo, N. Corbetta, P. F. Chamberlain, et al., *Lancet*, 350 (1997), 485-487.
- [191]. C. Colmant, M. Morin-Surroca, F. Fuchs, H. Fernandez, M. Senat., *j.ejogbrb*. 171 (2013) 197-204.
- [192]. J. Stocker, L. Evens, *Obstet Gynecol*, 50 (1977), 462-6.
- [193]. E. W Ugboma, H. A. Ugboma, *West Afr J Radiol*, 20 (2013), 1-3.
- [194]. M. Odeh, V. Granin, M. Kais, E. Ophir, J. Bornstein, *Obstet Gynecol Surv*, 64 (2009) 50-7.
- [195]. E. Sarasola, J. Rodriguez-Alarcón, L. Martín-Vargas, J. C. Melchor, M. Martinez de Pancorbo, *International Congress Series*, 1288 (2006), 691-693.
- [196]. B. Pertl, A. Sekizawa, O. Samura, I. Orescovic, PT Rahaim, DW Bianchi, *Hum. Genet.*, 106 (2000), 45-49.
- [197]. H. Honda, N. Miharuru, Y. Ohashi, O. Samura, M. Kinutani, T. Hara, et al., *Hum. Genet.*, 110 (2002), 75-79.
- [198]. A. Sekizawa, T. Kondo, M. Iwasaki, A. Watanabe, M. Jimbo, H. Saito et al., *Clin. Chem.*, 47 (2001), 1856-1858.
- [199]. W. Tungwiwat, G. Fucharoen, T. Ratanasiri, K. Sanchaisuriyaun, S. Fucharoen, *Clin. Chem.*, 334 (2003), 173-177.
- [200]. M. K. Finninga, L. S. Chitty, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 13 (2008), 69-75.

-
- [201]. M. K. Al-Yatama, A. A. Mustafa, A. Ali, A. Abraham, Z. Khan, *Prenat. Diagn.* 21 (2001), 399-402.
- [202]. S. Majer, M. Bauer, E. Magnet, A. Strele, E. Giegerl, M. Eder, U. Lang, B. Pertl, *Prenat. Diagn.* 13 (2007), 1219-1223.
- [203]. J. Deng, Y. Yang, X. Wang, T. Luan, *Trac Tendens anal. Chem.*, 55 (2014), 55.
- [204]. O. Mastrogianni, G. Theodoridis, K. Spagou, D. Violante et al., *Forensic Science International* 215 (2012), 105.
- [205]. V. Bessonneau, E. Boyaci, M. Maciazek-Jurczyk, J. Pawliszyn, *Analytica Chimica Acta* 856 (2015), 35.
- [206]. J. N. Miller and J. C. Miller, "Estadística y quimiometría para química analítica", 4th Edición, Prentice-Hall, Harlow, 2000.
- [207]. C. Henry, et al., *Marketing Research Report: "Diisocyanates and Polyisocyanates," Chemical Economics Handbook, SRI Consulting,* (2009), 12.
- [208]. D. Rowe; *Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances*, (2005), 152.
- [209]. S. Yapıcı, G. Uraz, E. Yılmaz, *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (2013), 98.
- [210]. R. Smolders, Holger M. Koch, Rebecca K. Moos, John Cocker, et al., *Toxicology Letters* 231 (2014), 249.

BIBLIOGRAFIA.

- [211]. Y. D. Jeong, Min Kyung Kim, Sung III Suh, et al., *Forensic Science International* 257 (2015), 84.
- [212]. N. Raikos, K. Christopoulou, et al., *J. Chromatogr. B*, 789 (2003), 59.
- [213]. M. Monteiro, M. Carvalho, R. Henrique, et al., *European Journal of Cancer* 50 (2014), 1993.
- [214]. E. Saguer, P.A. Alvarez, J. Sedman, A.A. Ismai, *Food Hydrocolloids* 33 (2013), 402.