

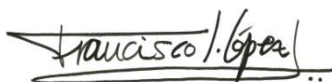
Tesis Doctoral:

**Sistemas Supramoleculares para la Extracción
de Contaminantes Orgánicos**

Trabajo presentado, para optar al grado de doctor, por

Francisco José López Jiménez

que lo firma en Córdoba, a 23 de abril de 2013

A handwritten signature in black ink, reading "Francisco J. López Jiménez", with a horizontal line underneath.

Firmado:

Francisco José López Jiménez
Licenciado en Ciencias Ambientales

con el V^oB^o de la directora

Soledad Rubio Bravo

A handwritten signature in blue ink, reading "Soledad Rubio Bravo", with a horizontal line underneath.

Firmado:

Dra. Soledad Rubio Bravo
Catedrática del Departamento de Química Analítica
de la Universidad de Córdoba

TITULO: *SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA EXTRACCIÓN DE
CONTAMINANTES ORGANICOS*

AUTOR: *FRANCISCO JOSÉ LÓPEZ JIMÉNEZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Soledad Rubio Bravo, catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, en calidad de directora de la Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Ciencias Ambientales, D. Francisco José López Jiménez,

CERTIFICA: Que la citada Tesis Doctoral “*Sistemas Supramoleculares para la Extracción de Contaminantes Orgánicos*” se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y que, a mi juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajos.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expide el presente certificado en Córdoba a 23 de abril de 2013.



Firmado:

Dra. Soledad Rubio Bravo
Catedrática del Departamento de Química Analítica
de la Universidad de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS:

Sistemas Supramoleculares para la Extracción de Contaminantes Orgánicos

DOCTORANDO: Francisco José López Jiménez

INFORME RAZONADO DE LA DIRECTORA DE LA TESIS

Las investigaciones que se incluyen en esta Tesis Doctoral han tenido como objetivo general de desarrollo de metodologías innovadoras para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales y de alimentos utilizando adsorbentes y disolventes supramoleculares. Los objetivos concretos de las mismas han sido la simplificación de la etapa de tratamiento de muestras y la extensión de la aplicabilidad de estos sistemas a nuevos formatos de extracción y mecanismos de interacción con los solutos no explorados previamente.

La Memoria de la Tesis incluye dos partes diferenciadas y relacionadas con el uso de adsorbentes y disolventes supramoleculares, respectivamente. En la primera parte se desarrolla una metodología analítica para la determinación de ésteres de ftalato en aguas residuales utilizando hemimicelas de dodecilsulfato sódico adsorbidas sobre alúmina y se evalúa el material silíceo mesoporoso MSU-1 para extracción en fase sólida, tal y como es producido en la síntesis y después de ser funcionalizado con micelas cilíndricas de tensioactivo.

El adsorbente hemimicelar (Anal. Chim. Acta, 551 **2005** p. 142) permite la concentración efectiva de los ftalatos y el método desarrollado permite el control analítico de estos contaminantes a los niveles establecidos por la legislación europea. En relación al uso de materiales mesoporosos en procesos de extracción (Anal. Chim. Acta; enviado para su publicación) el hallazgo más relevante es que estos materiales presentan efecto plantilla para sustancias anfífilas y por lo tanto la eficacia de extracción para las mismas es extremadamente elevada. Basa en esta propiedad, se ha desarrollado un método simple y rápido para la determinación de compuestos de benzalconio en aguas ambientales.

En la segunda parte de la Memoria se incluyen cuatro metodologías analíticas utilizando disolventes supramoleculares para la microextracción de contaminantes en muestras acuosas ambientales y de alimentos. En concreto, se propone la microextracción de colorantes tipo Sudán, cuyo uso como aditivo alimentario está prohibido por la legislación europea, en muestras de alimentos contenidos en salsas con chile rojo (Food Chem., 121 **2010** p. 763); la microextracción de alteradores endocrinos (hormonas naturales y sintéticas y xenoestrógenos) en sedimentos fluviales (J. Chromatogr. A, enviado para su publicación); la microextracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de alimentos legislados por la Unión Europea (Food Chem., enviado para su publicación) y la microextracción en una gota de clorofenoles en muestras acuosas (J. Chromatogr. A, 1195 **2008** p. 25). Los disolventes supramoleculares utilizados estuvieron constituidos por micelas inversas de ácido octanoico y decanoico. Las innovaciones más relevantes incluidas en la Parte II de la Memoria hacen referencia al uso de disolventes supramoleculares como materiales de acceso restringido, lo que permite excluir a las macromoléculas en el proceso de extracción y, por tanto, posibilita la limpieza de la muestra durante la etapa de extracción, y la propuesta por vez primera de la microextracción en una gota de disolvente supramolecular, habiéndose establecido los aspectos teóricos y prácticos relacionados con la aplicación de este formato a este tipo de disolventes.

Además de las publicaciones científicas derivadas de las investigaciones realizadas, se han presentado once contribuciones a congresos, 7 nacionales y 4 internacionales. El Doctorando ha obtenido el Diploma de Estudios Avanzados dentro del programa de doctorado de Química Fina, con mención de calidad, que se imparte en la Universidad de Córdoba, obteniendo la máxima calificación en las asignaturas cursadas y en el trabajo de investigación presentado.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 23 de abril de 2013

Firma de la directora



Fdo.: Dra. Soledad Rubio Bravo

Tesis doctoral:

Sistemas Supramoleculares para la Extracción de Contaminantes Orgánicos

Francisco José López Jiménez



UNIVERSIDAD DE CORDOBA



Departamento de
Química Analítica



A mis padres,
que lo han hecho posible.

A Ara,
que ha compartido cada momento.

A mis compañeros,
que han sido, y son, amigos.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario, con referencia AP2003-2840, que me ha posibilitado la dedicación a esta Tesis Doctoral durante cuatro años, así como el apoyo económico del grupo FQM-186 que ha cubierto el resto del tiempo necesario para concluir este trabajo.

ÍNDICE

Objeto	11
Contenido	17
Summary	21
Introducción	25
1. Problemática del análisis de contaminantes orgánicos en muestras ambientales y agroalimentarias.....	27
2. Tendencias en las técnicas de extracción usadas en análisis químico.....	29
3. Sistemas supramoleculares en procesos de extracción analítica.....	36
3.1. Conceptos generales.....	36
3.2. Metodologías de extracción basadas en agregados moleculares.....	37
3.3. Propiedades de los agregados moleculares.....	42
3.4. Hemimicelas y admicelas.....	43
3.4.1. Descripción.....	43
3.4.2. Mecanismos de adsolubilización de los analitos.....	48
3.4.3. Modo de operación.....	50
3.5. Materiales mesoporosos.....	51
3.5.1. Descripción.....	51
3.5.2. Tipos de silicatos mesoporosos.....	53
3.5.3. Características de los materiales mesoporosos relevantes en procesos de adsorción.....	55
3.6. Coacervados.....	59
3.6.1. Descripción.....	59
3.6.2. Mecanismos y cinética de separación de fases.....	61
3.6.3. Diagramas de fases.....	63
3.6.4. Mecanismos de solubilización/extracción de los analitos.....	66
3.6.5. Modos de operación.....	67
Parte I: Adsorbentes para SPE: hemimicelas y sólidos mesoporosos	69
1. Introducción.....	71
1.1. Aplicaciones analíticas de hemimicelas.....	71
1.2. Los ésteres de ftalato: Usos y toxicidad.....	74
1.3. Aplicaciones analíticas de los sólidos mesoporosos.....	76
1.4. Compuestos de benzalconio: Usos y toxicidad.....	77
Capítulo 1: Determination of phthalate esters in sewage by hemimicelle-based solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry	79
Capítulo 2: Potential of non-ionic surfactant-templated mesoporous silica for the solid phase extraction of organic compounds	97
Parte II: Extracción con disolventes supramoleculares	125
1. Introducción.....	127
1.1. Aplicaciones analíticas de los disolventes supramoleculares.....	127
1.2. Sudanés.....	131
1.3. Sustancias estrogénicas.....	132
1.4. PAHs.....	133
1.5. Clorofenoles.....	134

Capítulo 3: Supramolecular solvent-based microextraction of Sudan dyes in chilli-containing foodstuffs prior to liquid chromatography-photodiode array determination.....	135
Capítulo 4: Restricted access property supramolecular solvents for combined microextraction of endocrine disruptors in sediment and sample cleanup prior to their quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry.....	153
Capítulo 5: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in food by vesicular supramolecular solvent-based microextraction and LC-fluorescence detection.....	175
Capítulo 6: Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography. Theoretical and practical considerations.....	193
Resumen y Discusión de los Resultados	219
1. Introducción.....	221
2. Materiales adsorbentes para SPE.....	226
2.1. Hemimicelas de dodecilsulfato sobre alúmina para la extracción de ftalatos en aguas residuales.....	226
2.1.1. Formación de hemimicelas.....	227
2.1.2. Muestras.....	228
2.1.3. Extracción.....	230
2.1.4. Cuantificación.....	233
2.2. El sólido mesoporoso MSU-1 para la extracción en fase sólida de compuestos orgánicos.....	234
2.2.1. Síntesis y características del material MSU-1.....	236
2.2.2. Evaluación de la capacidad de adsorción de MSU-1.....	237
2.2.3. Evaluación de la capacidad de adsorción de MSU-1 funcionalizado con micelas cilíndricas de tensioactivos no iónicos y catiónicos.....	240
2.2.4. Extracción de compuestos de benzalconio en muestras de agua de río y residual usando el sólido mesoporoso MSU-1.....	242
3. Disolventes supramoleculares.....	245
3.1. Extracción líquido-líquido-sólido de colorantes Sudán en salsas con chile.....	246
3.1.1. Características del disolvente supramolecular.....	247
3.1.2. Muestras.....	249
3.1.3. Extracción.....	249
3.1.4. Cuantificación.....	251
3.2. Extracción de sustancias estrogénicas en sedimentos fluviales.....	253
3.2.1. El disolvente supramolecular de 1-decanol/THF/agua.....	254
3.2.2. Muestras.....	256
3.2.3. Extracción.....	256
3.2.4. Cuantificación.....	258

3.3. Extracción líquido-sólido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en alimentos.....	259
3.3.1. Síntesis y características del disolvente supramolecular.....	260
3.3.2. Muestras.....	262
3.3.3. Extracción.....	263
3.3.4. Cuantificación.....	265
3.4. Microextracción de clorofenoles en una gota de disolvente supramolecular.....	267
3.4.1. Formación de gotas de disolvente supramolecular	268
3.4.2. Extracción.....	271
3.4.3. Cuantificación.....	273
Conclusiones.....	277
1. Conclusiones generales.....	279
2. Conclusiones específicas.....	280
Apéndice 1: Publicaciones Científicas Derivadas de la Tesis Doctoral.....	285
Apéndice 2: Contribuciones a Congresos.....	291

OBJETO

La determinación de contaminantes en matrices de interés medioambiental o agroalimentario se ha convertido en una prioridad en el contexto de legislaciones cada vez más estrictas que tienen como objetivo la evaluación y el control de la exposición humana a sustancias con potenciales efectos adversos sobre la salud. Hay por tanto una creciente demanda de metodologías analíticas que proporcionen la información requerida de manera fiable en el menor tiempo posible y con costes reducidos

A pesar del avance espectacular que se ha producido en los últimos años en relación a la instrumentación científica, el tratamiento de muestras continúa teniendo un papel primordial en análisis químico y constituye una de las etapas clave del proceso analítico. En este contexto, muchos de los esfuerzos realizados en I+D+I en las dos últimas décadas se han orientado al desarrollo de procesos de extracción y purificación de muestras que sean más económicos, rápidos, simples, eficientes, seguros y ecológicos. Uno de los motores que ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de extracción ha sido la reducción del consumo de disolventes orgánicos, y entre las estrategias desarrolladas, algunas ya ampliamente aplicables, como el uso de microextracción en fase sólida, técnicas de extracción miniaturizadas y uso de energías auxiliares. Asimismo, se ha prestado especial atención al uso de disolventes alternativos, principalmente los fluidos supercríticos y, más recientemente, los líquidos iónicos.

El objeto general de las investigaciones que se presentan en la Memoria de esta Tesis Doctoral es evaluar el uso de disolventes y adsorbentes supramoleculares en procesos de microextracción de contaminantes y limpieza de muestras

medioambientales y alimentarias con el fin de desarrollar metodologías de tratamiento de muestras innovadoras y competitivas.

Los sistemas supramoleculares ofrecen prestaciones de gran relevancia para los procesos de extracción que derivan de las propiedades anfílicas de las moléculas que los integran y la morfología de la estructura en la que se autoensamblan. Así, los agregados muestran regiones de diferente polaridad que proporcionan microambientes diferenciados para los analitos de acuerdo a la polaridad de los mismos y por tanto pueden extraerse compuestos iónicos y en un amplio intervalo de polaridad. La eficacia de extracción es generalmente muy elevada dado el gran número de centros enlazantes que contienen los agregados y los mecanismos de interacción mixta que ofrecen. El tipo de interacción deseada puede modificarse variando el grupo polar o la cadena hidrocarbonada del anfífilo, lo que confiere a estos materiales una gran versatilidad ya que el número de compuestos anfílicos sintéticos y naturales es muy elevado. Desde el punto de vista práctico, los disolventes y adsorbentes supramoleculares se sintetizan mediante procesos de autoensamblado que se producen de forma espontánea en las condiciones ambientales adecuadas y están al alcance de cualquier laboratorio. Son además poco volátiles e inflamables y se adaptan a los formatos convencionales y miniaturizados de extracción. Constituyen por tanto una alternativa interesante a los disolventes orgánicos y adsorbentes convencionales.

La investigación que se presenta en esta Memoria ha tenido como objetivos específicos:

- 1) Evaluar la capacidad de los sistemas supramoleculares para proporcionar selectividad a las extracciones de contaminantes en muestras ambientales y/o agroalimentarias utilizando dos estrategias: efecto plantilla en adsorbentes y exclusión por tamaño de macromoléculas de la matriz en disolventes.
- 2) Desarrollar nuevos formatos de microextracción líquido-líquido utilizando disolventes supramoleculares.
- 3) Desarrollar estrategias innovadoras para la microextracción de contaminantes orgánicos prioritarios y emergentes en muestras líquidas y sólidas en análisis alimentario y ambiental.

Paralelamente, la formación del doctorando ha sido un objetivo fundamental y se ha desarrollado con actividades complementarias a la labor investigadora que se recogen en la parte final de la Memoria: publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral (Apéndice 1) y asistencia y presentación de comunicaciones a congresos (Apéndice 2).

CONTENIDO

La presente Memoria de Tesis Doctoral comienza con una Introducción General en la que se describen aspectos teóricos y prácticos relevantes acerca de los tres tipos de sistemas supramoleculares utilizados en las investigaciones que se recogen en la Memoria: hemimicelas y admicelas, materiales mesoporosos y coacervados o disolventes supramoleculares.

Los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas se han estructurado en dos Partes relacionadas respectivamente con el uso de adsorbentes y disolventes supramoleculares.

PARTE I: Adsorbentes para extracción en fase sólida: hemimicelas y materiales mesoporosos silíceos. Dividida en dos capítulos, la Parte I de esta Memoria incluye las investigaciones basadas en el uso de sistemas supramoleculares adsorbentes. En primer lugar se detallan los resultados obtenidos con el empleo de hemimicelas de dodecilsulfato adsorbidas sobre alúmina para la extracción en fase sólida de ésteres del ácido ftálico (ftalatos o PAEs) en aguas residuales urbanas. A continuación se exponen las investigaciones llevadas a cabo en torno al empleo de la estructura obtenida por autoensamblaje del tensioactivo tergitol 15-S-12 como molde para la síntesis del material inorgánico mesoporoso MSU-1 y el uso de éste en la SPE de compuestos de benzalconio en muestras de agua residual utilizando el efecto plantilla del material mesoporoso.

PARTE II: Extracción con disolventes supramoleculares. En esta parte se incluyen las investigaciones realizadas sobre el empleo de disolventes supramoleculares en extracciones analíticas. Estos disolventes se han obtenido a

partir de diferentes tipos de agregados (micelas inversas y vesículas), se han aplicado a muestras de diferente naturaleza (sólidas y líquidas) y los procesos de microextracción se han desarrollado en diferente formato (líquido-líquido-sólido, líquido-sólido y en una gota). En el tercer capítulo se trata la microextracción líquido-líquido-sólido de colorantes de tipo Sudán en salsas con chile en la que la coacervación de micelas inversas se produce en presencia de la muestra dispersada en agua. El capítulo cuatro versa sobre el empleo de agregados de alcohol en tetrahidrofurano y agua para la microextracción de diferentes sustancias estrogénicas presentes en muestras de sedimentos con la exclusión de ácidos húmicos y fúlvicos. A continuación se exponen las investigaciones relacionadas con el desarrollo de un método de microextracción líquido-sólido para el análisis de PAHs en alimentos sólidos (carnes y pescados) en el que el disolvente supramolecular está constituido por agregados vesiculares. En el sexto capítulo, se describe por vez primera la aplicación de disolventes supramoleculares en el formato de microextracción en una gota. Se establecen los principios y los parámetros de operación básicos y se desarrolla un método para la determinación de clorofenoles en agua.

La Memoria se completa con el resumen general y la discusión de los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas, destacando las aportaciones más innovadoras. Por último se exponen las principales conclusiones obtenidas en los trabajos de investigación desarrollados.

Se anexan a esta Memoria dos apéndices en los que se recogen los artículos publicados en revistas internacionales especializadas y las aportaciones en congresos que se han derivado de la realización de esta Tesis Doctoral.

SUMMARY

The results of the investigations of this Thesis have been divided in two sections. An Introduction is presented first that provides a general view of the main theoretical and practical aspects reported for the three types of supramolecular systems used in these investigations, namely hemimicelles, mesoporous materials and coacervates or supramolecular solvents. Main contents of the two sections are summarized below.

SECTION I: Adsorbents for solid phase extraction (SPE): hemimicelles and silica mesoporous materials. This section includes two chapters. The first one describes the results obtained from the use of hemimicelles of dodecylsulphate as an adsorbent in SPE for the extraction of phthalic acid esters from wastewater. The second one deals with the evaluation of a silica mesoporous material (MSU-1) in the extraction of benzalkonium compounds from wastewater using the template effect. MSU-1 was synthesized from autoassembled structures of the nonionic surfactants Tergitol 15-S-12.

SECTION II: Supramolecular solvent-based microextraction. The supramolecular solvents (SUPRAS) used in the investigations reported in this section have been obtained from different types of aggregates (reversed micelles and vesicles), they have been applied to the extraction of contaminants from a variety of food and environmental samples, and microextractions have been carried out involving different formats (e.g. liquid-liquid-solid, liquid-solid and single drop microextraction) Thus, the third chapter in this Thesis deals with the microextraction of Sudan dyes from chili-containing sauces using SUPRAS made up of reverse micelles of decanoic acid, which was synthesized in the presence of

the sample and therefore three phases were in equilibrium after extraction, namely the SUPRAS, the equilibrium hydroorganic phase and the non dissolved sample. In the fourth chapter, a SUPRAS made up of reverse micelles of decanol with restricted access properties is proposed for the simultaneous microextraction and cleanup of endocrine disruptors from sediments. Humic and fulvic acids are not extracted and SUPRAS extracts are analyzed directly without further treatment. The fifth chapter deals with the microextraction of four polycyclic aromatic hydrocarbons considered as an indicator of food contamination for these carcinogenic. For purpose a SUPRAS made up of vesicular aggregates of octanoic acid was applied to the microextraction of these PAHs in meat and fish foodstuffs. The sixth chapter describes the use of SUPRAS in single drop microextractions for the first time. Theoretical and practical aspects of this microextraction format are discussed in detail and a method for the determination of chlorophenols in environmental waters is developed.

This Thesis report also includes a part in which the results are discussed as a whole, highlighting the most relevant contributions, and a last section where the main conclusions drawn from research work are shown.

Finally, two appendices are annexed to this Thesis report, where the scientific publications and congress contributions derived from this thesis are compiled.

INTRODUCCIÓN

1. PROBLEMÁTICA DEL ANÁLISIS DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y AGROALIMENTARIAS

La Agencia Europea de Compuestos Químicos (European Chemicals Agency, ECHA) establecida en Helsinki, es la autoridad que está llamada a convertirse en la principal reguladora en materia de seguridad de los productos químicos. Para ello, la Unión Europea (UE) ha establecido una nueva normativa fundamentada sobre los pilares de cuatro reglamentos europeos: El REACH, (acrónimo de Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals), que entró en vigor en junio de 2007⁽¹⁾, se adoptó con el fin de mejorar la protección de la salud humana y el medioambiente contra los riesgos que pueden presentar los productos químicos, a la vez que se potencia la competitividad de la industria química de la UE. El REACH fomenta igualmente métodos alternativos para la valoración del peligro de las sustancias con el fin de reducir el número de ensayos realizados con animales. El CLP, (acrónimo de Classification, Labelling and Packaging)⁽²⁾ es el Reglamento que tiene por objeto garantizar una comunicación clara de los peligros que presentan las sustancias químicas a los trabajadores y a los consumidores a través del correcto etiquetado de los productos químicos. El Reglamento sobre

[1] Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión

[2] Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006.

productos biocidas^[3] regula la comercialización y el uso de los productos biocidas, que se utilizan para proteger a los seres humanos, animales, materiales o artículos contra organismos nocivos, como plagas o bacterias, gracias a la acción de sustancias activas que contienen estos productos. Este reglamento pretende mejorar el funcionamiento del mercado de biocidas en la UE, garantizando un alto nivel de protección de las personas y del medioambiente. Por último, el Reglamento del consentimiento fundamentado previo^[4] regula la importación y exportación de determinadas sustancias químicas e impone obligaciones a las empresas que deseen exportarlas a países terceros.

A causa de toda esta nueva regulación, existe la necesidad de establecer un control analítico de contaminantes en matrices ambientales y agroalimentarias que plantea importantes retos derivados de la complejidad de las muestras que son objeto de análisis, la amplia variedad de estructuras de los residuos orgánicos y contaminantes de interés, y las bajas concentraciones a las que estos deben ser detectados o cuantificados ($\text{ng-}\mu\text{g L}^{-1}$ y $\text{ng-}\mu\text{g Kg}^{-1}$).^[5] Un aspecto clave en el control analítico de contaminantes es el uso de métodos que proporcionen confirmación inequívoca y cuantificación exacta. Otras características deseables para estos métodos son rapidez, simplicidad y adecuación a los principios de la química verde.

A pesar del gran desarrollo instrumental producido en la última década, son muy pocas las muestras ambientales y agroalimentarias que pueden analizarse de forma directa o después de un tratamiento simple. El tratamiento de las muestras continúa siendo la etapa más crítica en un proceso analítico ya que engloba múltiples operaciones que requieren considerable participación humana, son lentas (suponen entre el 70 y 90% del tiempo consumido en un proceso analítico global) y constituyen una fuente potencial de errores analíticos. Por otro lado, es la etapa que entraña mayores riesgos personales y medioambientales ya que se utilizan ácidos, disolventes, gases a presión, etc. que pueden afectar tanto a la seguridad e higiene del personal del laboratorio como al medioambiente. Como consecuencia, se ha realizado un enorme esfuerzo en I+D en los últimos años para simplificar los procesos de extracción analítica con el objeto de aumentar la capacidad del

[3] Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas

[4] Reglamento (UE) nº 649/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de Julio de 2012 relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos.

[5] Richardson, S.D.; Ternes, T.A. *Anal. Chem.* 77 (2005) 3807

procesamiento de muestras, mejorar la calidad de los resultados obtenidos y reducir el consumo de disolventes orgánicos.

2. TENDENCIAS EN LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN USADAS EN ANÁLISIS QUÍMICO

En la actualidad, la extracción/concentración de los contaminantes químicos presentes en muestras líquidas se realiza preferentemente mediante extracción en fase sólida (SPE).⁽⁶⁻⁹⁾ Respecto al formato convencional, donde la muestra líquida se filtra en modo *off-line* u *on-line* a través de un cartucho que contiene el adsorbente, las investigaciones en la última década se han centrado en el desarrollo de nuevos materiales con dos objetivos: proporcionar elevada capacidad de retención para compuestos de muy diferente polaridad, orientados fundamentalmente al análisis de multirresiduos, o proporcionar elevada selectividad para la retención de compuestos específicos o grupos de compuestos. Simultáneamente se han desarrollado nuevos formatos para extracción en fase sólida cuyo objetivo ha sido simplificar, miniaturizar y automatizar el proceso de extracción a la vez que reducir o eliminar el consumo de disolventes orgánicos.⁽¹⁰⁾ Entre los formatos desarrollados destacamos la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción por adsorción en barras magnéticas agitadoras (SBSE).

Dentro de los materiales adsorbentes que permiten la retención de compuestos en un amplio intervalo de polaridad destacan los siguientes:

a) Copolímeros de divinilbenceno/n-vinilpirrolidona (patentados por Waters con el nombre comercial OASIS HLB). Su elevada área específica (en torno a 800 m²g⁻¹) y la presencia en el polímero del grupo pirrolidona, que es un aceptor de hidrógeno, mejora notablemente la retención de compuestos polares, mientras que el polímero divinilbenceno permite la retención eficaz de los compuestos hidrófobos. El adsorbente es estable en un amplio intervalo de pH (1-14) y ha encontrado amplia aplicación en el análisis de multirresiduos de drogas y sus metabolitos en fluidos biológicos y contaminantes en muestras acuosas ambientales.

[6] Wardencki, W.; Curylo, J.; Namiesnik, J. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 275

[7] Fidalgo-Used, N.; Blanco-González, E.; Sanz-Medel, A. *J. Chromatogr. A* 590 (2007) 1

[8] Smith, R.M. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3

[9] Hennion, M.C. *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3

[10] Farré, M.; Pérez, S.; Gonçalves, C.; Alpendaurada, M.F.; Barceló, D. *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1347

b) Adsorbentes que proporcionan mecanismos de retención mixto (p.e. Isolute HCX y HAX). Están constituidos por un sólido al que se enlazan cadenas alquílicas (C8 y C18) y grupos cambiadores de iones y están especialmente indicados para la SPE de drogas ácidas y básicas en matrices biológicas. El doble mecanismo de retención de estos adsorbentes permite la elución secuencial de las interferencias de la matriz y proporciona extractos fácilmente analizables por LC/MS.

c) Adsorbentes de carbono. Inicialmente se utilizaron en SPE adsorbentes de carbono no poroso con un área superficial muy baja (por ejemplo ENVI-Carb, comercializado por Supelco), sin embargo, la retención de analitos polares era superior a la correspondiente en sílice-C18. En la actualidad se investiga extensamente el uso de fulerenos y nanotubos de carbono en SPE. Ambas formas alotrópicas del carbono presentan una elevada área superficial y se han aplicado hasta la fecha a la extracción de diferentes tipos de compuestos tales como alteradores endocrinos, proteínas, compuestos orgánicos volátiles, iones metálicos, etc.⁽¹¹⁻¹²⁾

Los materiales adsorbentes selectivos que se han desarrollado para SPE están especialmente indicados para, simultáneamente, extraer, concentrar y limpiar contaminantes concretos o grupos de contaminantes estructuralmente relacionados.⁽¹³⁾ En general, el desarrollo de estos materiales es complejo. Los adsorbentes selectivos de mayor interés son:

a) Los materiales de acceso restringido (Restricted Access Materials, RAM). Permiten el acoplamiento en línea de las etapas de limpieza y extracción de muestras biológicas (plasma y suero) con cromatografía de líquidos. Para ello combinan la exclusión por tamaño de proteínas y otras macromoléculas con el enriquecimiento simultáneo de analitos de bajo peso molecular en la superficie de los poros internos del material a través de mecanismos de retención convencionales (interacciones hidrófobas, iónicas, etc) o específicos.⁽¹⁴⁻¹⁵⁾

[11] Pyrzynska, K. *Anal. Sci.* 23 (2007) 631

[12] Valcárcel, M.; Simonet, B.M.; Cárdenas, S.; Suárez, B. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1783

[13] Augusto, F.; Carasek, E.; Gomes Costa Silva, R.; Regina Revellino, S.; Domingues Batista, A.; Martendal, E. J. *Chromatogr. A* 1217 (2010) 2533

[14] Mullett, W.M. *J.Biochem.Biophys. Methods* 70 (2007) 263

[15] Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L. *J. Chromatogr.B* 801 (2004) 141

b) Los inmunoadsorbentes (ISs), constituidos por anticuerpos unidos mediante enlaces covalentes, no covalentes o adsorbidos a un soporte adecuado, extraen selectivamente a los analitos antígenos mediante un proceso de reconocimiento molecular, siendo los anticuerpos monoclonales más selectivos y reproducibles que los policlonales. Los ISs han encontrado amplia aplicabilidad en el área medioambiental y biológica,⁽¹⁶⁾ siendo su principal limitación el alto coste de la producción de los anticuerpos y la escasa reusabilidad.

c) Los polímeros de impresión molecular (MIPs) se obtienen mediante el ensamblaje de una matriz polimérica alrededor de un analito o molécula diana, de manera que se crea una huella del analito. Una vez obtenido el polímero el compuesto diana es extraído quedando así huecos libres con “memoria” selectiva que reconocerán de forma específica nuevas moléculas del contaminante empleado como molde. La afinidad y selectividad del sitio de unión por el analito es, muchas veces, comparable a la desarrollada por los anticuerpos. Entre las ventajas de estos materiales destacan la sencillez y rapidez de preparación, la elevada estabilidad química, física y térmica y el bajo coste. Presentan el inconveniente de la incompleta eliminación de las moléculas molde lo que origina problemas de contaminación. Los MIPs se han aplicado ampliamente en el área medioambiental y biológica.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Entre los nuevos formatos de SPE, la microextracción en fase sólida (SPME) es el más popular. Se basa en la extracción de los analitos usando una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico.^(6,8) La técnica es simple, presenta bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y puede usarse para todo tipo de matrices; aire, agua y en el espacio de cabeza para sólidos. El principal inconveniente deriva de la limitada capacidad de la fibra, debido a que la cantidad de recubrimiento es muy pequeña, por lo que la sensibilidad alcanzada no es adecuada para muchos contaminantes, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos.

[16] Delaunay, N.; Pichon, V.; Hennion, M.C. *J. Chromatogr. A* 745 (2000) 15

[17] Tamayo, F.G.; Turiel, E; Martín-Esteban A. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 32

[18] Pichon, V. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 41

[19] Stevenson, D. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 154

La extracción por adsorción en barras magnéticas agitadoras (SBSE) se basa en el uso de un imán situado en el interior de una barra de vidrio que a su vez está recubierta de una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Comparada con SPME, la cantidad de fase adsorbente en la barra de vidrio es 50-250 veces mayor que en la fibra por lo que se obtienen menores límites de detección. Las extracciones se realizan por inmersión de la barra en la muestra líquida o situando la misma en el espacio de cabeza por encima de la muestra líquida o sólida cuando los compuestos de interés son volátiles o semivolátiles (headspace sorptive extraction, HSSE). SBSE se ha aplicado al análisis ambiental, de alimentos y en biomedicina.⁽²⁰⁾ Su principal limitación es que hasta la fecha solo se comercializan barras recubiertas de PDMS y por tanto solo son aplicables a la extracción de compuestos apolares. La aplicación de SBSE a compuestos polares y semipolares requiere un paso previo de derivatización del material adsorbente.

La extracción líquido-líquido es mucho menos utilizada que SPE para el tratamiento de muestras líquidas ya que en su formato convencional consume elevados volúmenes de disolventes orgánicos. Sin embargo, en los últimos años ha habido un considerable esfuerzo en I+D para miniaturizar el proceso y se han desarrollado técnicas competitivas que utilizan volúmenes de disolvente a niveles de microlitros. Estas técnicas se clasifican en dos grandes grupos: microextracción en fase líquida (LPME) y microextracción en una gota (SDME).⁽²¹⁻²²⁾

Se han descrito dos tipos de sistemas en LPME: de dos fases (LLME)⁽²³⁻²⁴⁾ y tres fases (LLLME).⁽²⁵⁻²⁶⁾ La microextracción líquida en dos fases puede hacerse inmovilizando un disolvente inmiscible (fase aceptora) en una fibra hueca porosa⁽²³⁾, o bien dispersando una pequeña cantidad de dicho solvente en la fase donadora, lo que se denomina microextracción dispersiva en fase líquida (DLLME).⁽²⁴⁾ En el sistema de tres fases (LLLME), el analito se extrae de la fase acuosa a través de un disolvente orgánico que impregna los poros de una fibra hueca hasta otra fase acuosa que se encuentra en el interior de la fibra. La composición de los dos

[20] David, F.; Sandra, P. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 54

[21] Jeannot, M.A.; Przyjazny, A. Kokosa, J.M.; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2326

[22] Psillakis, E.; Kalogerakis, N. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53

[23] He, Y.; Lee, H.K. *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634

[24] Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342

[25] Ma, M.; Cantwell, F.F. *Anal. Chem.* 71 (1999) 388

[26] Ma, M.; Cantwell, F.F. *Anal. Chem.* 70 (1998) 3912

disolventes aceptores es fundamental para el éxito de la extracción, ya que hay que ajustar lo más posible las constantes de distribución del analito a extraer.

En SDME, una gota de disolvente (1-20 μL) se coloca en la punta de una jeringa y se sumerge directamente en la muestra acuosa (DI-SDME)⁽²¹⁾ o en un flujo continuo de muestra (CFME),⁽²⁷⁾ o bien, cuando los componentes a extraer son volátiles, se coloca en el espacio de cabeza de un vial (HS-SDME).⁽²⁸⁾ Una vez terminada la extracción, la gota se retrae a la jeringa y se analiza mediante LC o GC.⁽²⁹⁾

La extracción/concentración de los contaminantes químicos presentes en muestras sólidas se lleva a cabo rutinariamente utilizando disolventes orgánicos. Con objeto de alcanzar suficiente sensibilidad y selectividad, el proceso requiere generalmente el tratamiento de una cantidad considerable de muestra, el desarrollo de extracciones repetidas para asegurar el aislamiento completo del analito de interés, una etapa de limpieza del extracto y la evaporación del disolvente. En este contexto, las investigaciones en los últimos años se han centrado en el desarrollo de estrategias que permitan reducir el consumo de disolventes y el tiempo necesario para la extracción. Las estrategias con mayor éxito se han basado en el aumento de la eficacia de la extracción mediante el uso de energías auxiliares (ej. extracción asistida por microondas MAE, extracción acelerada por ultrasonidos y extracción con líquidos presurizados PLE), el uso de disolventes alternativos (p.e. fluidos supercríticos SFE⁽³⁰⁾), o el uso combinado de disolventes y adsorbentes para lograr una extracción simultánea a la limpieza de la muestra (dispersión de la matriz en fase sólida MSPD).

Los distintos equipos diseñados para llevar a cabo la extracción asistida por microondas (MAE) difieren en el tipo de energía aplicada a la muestra (multimodo o focalizada) y en el uso o no de sobrepresión. Generalmente, los sistemas cerrados (los que operan a alta presión) son multimodo, es decir la radiación generada se dispersa de forma aleatoria en una cavidad. Los sistemas abiertos (en los que el proceso se lleva a cabo a presión atmosférica) son sistemas focalizados o monomodo, es decir la radiación de microondas se confina en un espacio mucho

[27] Liu, W.; Lee, H.K. *Anal. Chem.* 72 (2000) 4462

[28] Theis, A.L.; Waldack, A.J.; Hansen, S.M.; Jeannot, M.A. *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651

[29] Jeannot, M.A.; Cantwell, F.F. *Anal. Chem.* 69 (1999) 2935

[30] Herrero, M.; Mendiola, J.A.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2495

más reducido, donde se sitúa la muestra, y por tanto la radiación que llega a la misma es más intensa que en los sistemas multimodo. Existen numerosas revisiones en las que se describen los equipos utilizados, los principios en los que se basa la técnica y las aplicaciones desarrolladas hasta la fecha.⁽³¹⁻³³⁾

En la extracción asistida por ultrasonidos (sonidos con una frecuencia superior a la que el oído humano puede percibir, >20 kHz) se utilizan dos tipos de dispositivos; los baños y las sondas.⁽³⁴⁾ En los primeros, la reproducibilidad es muy baja debido a la falta de uniformidad en la transmisión de los ultrasonidos y la disminución de la potencia con el tiempo, por lo que su uso debería restringirse a operaciones como las de eliminación de gases disueltos, disolución etc., para las que han sido diseñadas. Las sondas ultrasónicas o sonotrodos focalizan su energía en una zona específica y producen resultados más reproducibles, aunque en general son poco robustos y dependen de la composición de la matriz de la muestra y del tamaño de partícula de la misma.

La extracción con líquidos presurizados (PLE), también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), implica el uso de disolventes a elevada temperatura (40-200°C) y presión (1000-2500 psi). En estas condiciones los disolventes aumentan el poder de solvatación y se incrementa la velocidad de extracción. La técnica tiene capacidad para realizar múltiples extracciones, puede automatizarse y ha encontrado una amplia aplicación en la extracción de contaminantes en muestras ambientales, biológicas y de alimentos.⁽³⁵⁻³⁸⁾ La USEPA (United States Environmental Protection Agency) ha adoptado esta técnica para el análisis de plaguicidas en suelos.⁽³⁹⁾ Frecuentemente, PLE se combina con SPE o SBSE para preconcentrar los analitos.

Los fluidos supercríticos son extractantes con propiedades intermedias entre los líquidos y los gases. Tienen viscosidad parecida a los gases, densidad

[31] Chen, L.; Song, D.; Tian, Y.; Ding, L.; Yu, A.; Zhang H. *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 151

[32] Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 90

[33] Jin, Q.; Liang, F.; Zhang, H.; Zhao, L.; Huan, Y.; Song, D. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 479

[34] Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41

[35] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Henández-Méndez J. *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1

[36] Ramos, L.; Kistenson, E.M.; Brinkman, U.A.Th. *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3

[37] Smith, R.M. *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 31

[38] Björklund, E.; Nilsson, T. *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 434

[39] EPA Method 3545, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1996

parecida a los líquidos y elevada difusividad.⁽⁴⁰⁾ La densidad del fluido, y por tanto su capacidad de solvatación para el soluto depende de la presión y la temperatura. El fluido más utilizado es el dióxido de carbono (punto crítico 31°C y 74 bares). Tiene baja polaridad y es ideal para la extracción de compuestos apolares. Mediante la adición de metanol (1-10%) aumenta la polaridad permitiendo su aplicación a la extracción de un amplio número de compuestos.⁽⁴¹⁻⁴²⁾

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica adecuada para la extracción de muestras de alimentos y biológicas sólidas, semisólidas y/o de elevada viscosidad.⁽⁴³⁻⁴⁴⁾ El procedimiento consiste en dispersar la muestra con un adsorbente tal como C8, C18, sulfato sódico, tierra de diatomeas, etc. hasta conseguir una mezcla homogénea. A continuación se procede al lavado de la mezcla con un pequeño volumen de disolvente o bien esta se sitúa en una minicolumna de SPE antes de la elución. El procedimiento es simple, versátil y ofrece la posibilidad de llevar a cabo la extracción y la purificación de la muestra en una única etapa con lo que se reduce el tiempo de análisis y el consumo de disolvente orgánico. La MSPD se utiliza ampliamente en la extracción de drogas en tejidos animales y multiresiduos de plaguicidas en frutas y verduras.⁽⁴⁵⁾

Las estrategias de extracción que se abordan en esta Tesis, al igual que las anteriormente expuestas, tienen como objetivo simplificar los procesos de extracción y reducir el consumo de disolventes orgánicos. Así, se investiga el uso de hemimicelas y admicelas en formato SPE convencional como materiales adsorbentes que proporcionan múltiples interacciones en los diferentes microambientes que los constituyen. Se utilizan asimismo materiales mesoporosos para la SPE selectiva de las moléculas utilizadas para el modelado del material en el proceso de síntesis (reconocimiento molecular). Por otro lado, se utilizan coacervados para la microextracción líquido-líquido y extracción en una gota de contaminantes en muestras de alimentos y aguas residuales, respectivamente.

[40] Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M.; Tena, M.T. *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*, Editorial Reverté (1993) Barcelona

[41] Pourmortazavi, S.M.; Hajimirsadeghi, S.S. *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 2

[42] Nemoto, S. *J. Pestic. Sci.* 32 (2007) 328

[43] Barker, S.A. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 151

[44] Bogialli, S.; Di Corcia, A. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 163

[45] Anastassiades, M.; Lehoutay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. *J. AOAC* 86 (2003) 412

3. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN ANALÍTICA

3.1. Conceptos generales

Los sistemas supramoleculares son entidades formadas por la asociación de dos o más moléculas unidas mediante enlaces intermoleculares.⁽⁴⁶⁾ *Enlace intermolecular* es un término genérico que incluye interacciones muy diversas, tales como interacciones electrostáticas, hidrófobas, enlaces de hidrógeno, enlaces π - π , etc. La característica común de estas interacciones es que no son covalentes, y por lo tanto, las entidades formadas lo hacen a través de reacciones reversibles. Sin embargo existe la idea, cada vez más generalizada, de que los enlaces covalentes relativamente débiles (por ejemplo los enlaces de coordinación) también pueden producir sistemas supramoleculares.⁽⁴⁷⁾ Recientemente se ha sugerido que deberían considerarse interacciones intermoleculares todas aquellas con una energía de enlace igual o inferior a 30 Kcal mol⁻¹ y en las que el equilibrio cinético se alcance en menos de 24 horas.⁽⁴⁸⁾ En general, los sistemas supramoleculares son termodinámicamente menos estables, cinéticamente más lábiles y dinámicamente más flexibles que las moléculas.^(46,49-51)

Los sistemas supramoleculares se clasifican en dos grandes grupos que se denominan supermoléculas y agregados moleculares.⁽⁵²⁻⁵³⁾ Las supermoléculas son especies oligomoleculares de estructura definida resultantes de la asociación intermolecular de dos o tres componentes. Constituyen los denominados sistemas anfitrión-huésped o receptor-substrato. El anfitrión o receptor es un compuesto macrocíclico (éter corona, éter cripta, ciclodextrina, etc.) que enlaza con el substrato de forma reversible y selectiva, basado en los principios de reconocimiento molecular.

[46] Lehn, J.M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives. A Personal Account*, John Wiley & Sons (1995) New York

[47] Olenyuk, B.; Whiteford, J.A.; Fenchtenkotter, A.; Stang, P.J. *Nature* 398 (1999) 796

[48] Anslyn, E.V. *J. Org. Chem.(Perspective)*72 (2007) 687

[49] Atwood, J.L.; Lehn, J.M.; Davies, J.E.D.; MacNicol, D.D. *Comprehensive Supramolecular Chemistry: 11-Volume Set*, F. Vogtle (Ed.), Pergamon Press (1996) Oxford

[50] Lehn, J.M. *Supramolecular Chemistry: Where it is and where it is going*, Ungaro, R.; Dalcanale, E. (Eds.) Kluwer (1999) Dordrecht

[51] Steed, J.W.; Atwood, J.L. *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons (2000) New York

[52] Fendler, J.H. *Membrane Mimetic Chemistry: characterizations and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems and polyions*. John Wiley & Sons (1982) New York

[53] Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470

Los agregados moleculares son entidades polimoleculares resultantes de la asociación espontánea de un número indefinido de componentes que constituyen una fase específica con características macroscópicas y organización microscópica más o menos definida, dependiendo de su naturaleza. Los agregados de mayor interés en química analítica son las micelas (acuosas e inversas), las microemulsiones y las vesículas. La característica esencial de estos sistemas supramoleculares es que los componentes que los integran son moléculas que contienen en su estructura una parte hidrófoba y otra hidrófila y/o contienen centros aceptores o donadores de protones.⁽⁵⁴⁾ Esta característica va a determinar que en los sistemas supramoleculares existan regiones con diferentes polaridad, acidez y viscosidad las cuales determinarán la región de solubilización del soluto dentro del sistema supramolecular y serán responsables de los efectos microambientales que ejercen sobre los sistemas químicos. Estos dos aspectos, solubilización y efectos microambientales, constituyen el fundamento de las aplicaciones analíticas de los sistemas supramoleculares en áreas tan diversas como espectroscopia, electroanálisis, cromatografía, electroforesis capilar, técnicas de extracción, análisis cinético, etc.^(53,55) La interfase entre Química Analítica y Química Supramolecular ha dado lugar a un campo interdisciplinar muy fructífero y en continua expansión denominado Química Analítica Supramolecular.^(48,56)

3.2. Metodologías de extracción basadas en agregados moleculares

El uso de agregados moleculares en procesos de extracción analítica constituye una alternativa prometedora al uso de disolventes orgánicos en extracción líquido-líquido y líquido-sólido y amplía el horizonte de las fases adsorbentes utilizadas en SPE.

Los agregados más utilizados hasta la fecha en disolución han sido las micelas acuosas e inversas y solo recientemente se ha propuesto el uso de vesículas. En fase heterogénea se han usado hemimicelas y admicelas adsorbidas sobre óxidos minerales y, en menor medida, sobre resinas de cambio iónico. En todos los casos, los agregados están constituidos por moléculas de tensioactivos que se asocian de

[54] Fuhrhop, J.H.; Koning, J. *Membranes and Molecular Assemblies: The synkinetic approach*, The Royal Society of Chemistry (1994) Cambridge

[55] Pramauro, E.; Pelizzetti, E. *Surfactants in Analytical Chemistry, Applications of Organized Amphiphilic Media*, Elsevier (1996) New York

[56] Rubio, S. *New Challenges of Supramolecular Chemistry in Environmental Analysis*. 11as Jornadas de Análisis Instrumental (Noviembre 2005) Barcelona

forma espontánea por encima de una concentración crítica. El tipo de agregado producido depende fundamentalmente de su estructura química y de la naturaleza del medio. La Figura 1 muestra una representación simplificada de las estructuras supramoleculares utilizadas como extractantes y la Tabla 1 muestra los tensioactivos más usados hasta la fecha.

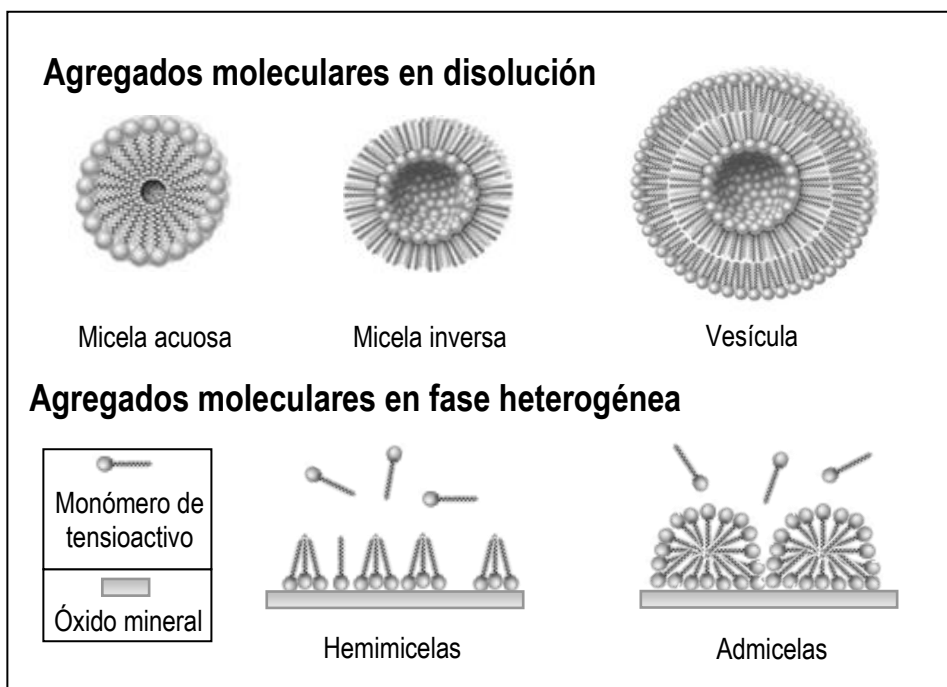
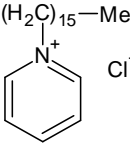
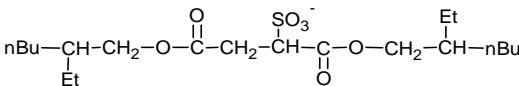
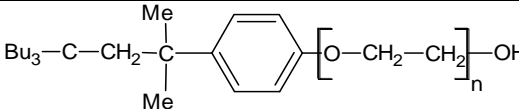
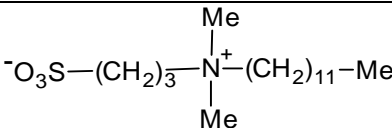


Figura 1: Representación simplificada de diferentes tipos de agregados moleculares

Existen diferencias morfológicas y estructurales entre los distintos tipos de agregados producidos en disolución que afectan al proceso de extracción. Así, aunque las micelas acuosas e inversas son entidades esféricas con diámetros muy similares (3-60 y 40-80 Å, respectivamente) las primeras se forman en agua y la segundas en disolventes apolares y de baja constante dieléctrica y por tanto, los medios de extracción utilizados son diferentes. El tamaño de las vesículas es considerablemente mayor (300-5000 Å) y como consecuencia, la capacidad de solubilización de éstas es superior a la de las micelas.

Tabla 1. Tensioactivos de uso común en extracciones analíticas

CATIONICOS	Bromuro de cetiltrimetil amonio (Br CTA)	$\text{Me}_3\text{-N}^+(\text{CH}_2)_{15}\text{-Me}$ Br^-
	Bromuro de dodeciltimetil amonio (Br DTA)	$\text{Me}_3\text{-N}^+(\text{CH}_2)_{11}\text{-Me}$ Br^-
	Cloruro de cetilpiridinio (CPC)	$(\text{H}_2\text{C})_{15}\text{-Me}$  Cl^-
ANIÓNICOS	Dodecil sulfato sódico (SDS)	$\text{Me-(CH}_2)_{11}\text{-SO}_3^-$ Na^+
	Bis (2-etilhexil)sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)	
NO IÓNICOS	Polietilén glicol tert-octil fenil eter (Triton X-114)	$\text{Bu}_3\text{-C-CH}_2\text{-C}(\text{Me})_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-[O-CH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n\text{-OH}$ 
	Ácido decanoico	$\text{CO}_2\text{H-(CH}_2)_8\text{-Me}$
ANFÓTEROS	3-(dodecildimetilamonio) propano-1-sulfonato (SB-12)	${}^-\text{O}_3\text{S-(CH}_2)_3\text{-N}^+(\text{Me})_2\text{-(CH}_2)_{11}\text{-Me}$ 

Un aspecto a considerar es que los agregados moleculares son muy estables, una vez formados permanecen inalterados durante semanas. Sin embargo, no son estructuras rígidas sino entidades dinámicas en equilibrio con los monómeros de tensioactivo en disolución. La escala de tiempo para la disociación de las micelas, es decir para la liberación de una molécula de tensioactivo y su subsiguiente reincorporación al agregado, es del orden de microsegundos. Por el contrario, los tiempos de residencia del tensioactivo en las vesículas son del orden de minutos a horas y por tanto estos agregados son considerablemente más rígidos.

Los agregados hemimicelares se forman cuando moléculas de tensioactivo cargadas se adsorben sobre la superficie de un material (generalmente un óxido mineral) de carga opuesta. La fuerza conductora de la asociación tensioactivo-soporte es la interacción iónica, pero la concentración crítica de tensioactivo a partir de la cual comienza la formación de agregados hemimicelares es aquella en la que aparecen interacciones hidrófobas entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas del tensioactivo adsorbido. La morfología de los agregados resultantes es la de conos invertidos (“teepee” en terminología anglosajona, Figura 1).

Las admicelas se forman cuando toda la superficie del óxido está cubierta por hemimicelas y por tanto la adsorción de nuevas moléculas de tensioactivo se produce a través de interacciones hidrófobas entre las cadenas hidrocarbonadas de los mismos. Su morfología y estructura es semejante a las micelas en disolución y al igual que éstas son estructuras dinámicas en equilibrio con los monómeros de tensioactivo (Figura 1).

Las metodologías de extracción basadas en el uso de agregados moleculares que mayor popularidad han alcanzado son las siguientes:

- Extracción con micelas acuosas (*Micellar extraction*). Las disoluciones acuosas micelares se han utilizado como disolventes para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas ambientales, fundamentalmente suelos y sedimentos,^(55,57-58) y para la extracción de una amplia variedad de productos biológicos en membranas celulares y cultivos microbiológicos.⁽⁵⁹⁾ Más recientemente, las micelas acuosas se están utilizando como disolventes en extracciones asistidas por microondas (*microwave assisted micellar extraction*) para la solubilización de contaminantes tales como hidrocarburos y plaguicidas en muestras de suelos y alimentos.⁽³¹⁾

- Extracción con micelas inversas (*Reverse micellar extraction*). En esta metodología se utiliza como extractante un disolvente apolar que contiene el tensioactivo por encima de la concentración micelar crítica. La metodología ha encontrado amplia aplicación en la extracción de biomoléculas, tales como proteínas y enzimas, debido

[57] Jafvert, C.T. *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 1039

[58] Diallo, M.S.; Abriola, L.M.; Weber, W.J. Jr. *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 1829

[59] Hinze W. L. *Ordered media in Chemical Separations. ACS Symp. Ser. 342*, ACS, Hinze W.L. and Armstrong D.W. (Eds.) (1987) Washintong DC

a la elevada estabilidad de las mismas en el extractante.⁽⁶⁰⁾ Asimismo, se ha usado para la extracción líquido-líquido de metales y compuestos orgánicos en disoluciones acuosas.⁽⁵⁵⁾ En estas aplicaciones, las micelas inversas constituyen un agente quelatante o formador de pares iónicos que posibilita la extracción de sustancias iónicas y ofrecen un medio con gran capacidad de solubilización debido a las diferentes interacciones que pueden establecer con los analitos.

• Ultrafiltración micelar (*Micellar-Enhanced Ultrafiltration, MEUF*). Se basa en la adición de agregados moleculares a la muestra. Los analitos se solubilizan en los mismos y seguidamente se separan por ultrafiltración a través de una membrana con un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para bloquear a estos agregados. Esta técnica de separación se ha utilizado principalmente para eliminar contaminantes en aguas, sobre todo metales iónicos⁽⁶¹⁾ y, en menor medida, disolventes orgánicos⁽⁶²⁾, y sustancias orgánicas, por ejemplo fenoles y colorantes.⁽⁶³⁻⁶⁴⁾

• Extracción coacervativa. Se basa en la separación de fases que experimentan los agregados moleculares en disolución mediante la acción de un agente coacervante (cambios en la temperatura de la disolución, el pH, adición de sales, adición de un disolvente en el que los agregados son poco solubles, etc). En el proceso, que ocurre de forma espontánea, se origina una nueva fase con un volumen muy reducido (coacervado) que contiene los agregados moleculares y se caracteriza por ser inmisible con la disolución en la que se originó y por tener una elevada capacidad para solubilizar los analitos. Por tanto, los coacervados pueden aplicarse en extracciones líquido-líquido y sólido-líquido. Durante muchos años, los procesos de extracción analítica basados en coacervación han utilizado casi de forma exclusiva el fenómeno de coacervación de tensioactivos no-iónicos causado al elevarse la temperatura de las disoluciones. Esta metodología, denominada de punto de nube (Cloud-Point Extraction, CPE) se ha aplicado fundamentalmente a la extracción de sustancias apolares en muestras acuosas ambientales^(53,61,65-67) y la

[60] Krishna S.H., Srinivas N.D., Raghavarao K.S., Karanth N.G. *Adv. Biochem. Eng./Biotech.* 75 (2002) 119

[61] Pramauro, E.; Prevot, A.B. *Recent Res. Develop. in Pure & Appl. Anal. Chem.* 1 (1998) 225

[62] Christian, S.D.; Scamehorn, J.F. *Surfactant Science Series* 33 (Surfactant-Bases Sep. Processes) (1989)

[63] Bielska, M.; Szymanowski, J. *Water Res.* 40 (2006) 2027

[64] Figueroa, M.C.; Weber, E.M. *Sep. Sci. Tech.* 40 (2005) 1653

[65] Sosa Ferrera, Z.; Padron Sanz, C.; Mahugo Santana, C.; Santana Rodriguez, J.J. *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 469

[66] Carabias-Martinez, R.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Moreno-Cordero, B.; Perez-Pavon, J.L.; Fernandez-Laespada, E. *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251

[67] Halko, R.; Hutta, M. *Chemicke Listy* 94 (2000) 990

extracción de quelatos metálicos.⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾ En los últimos años, se han descrito nuevos procesos de coacervación y se han abordado nuevas aplicaciones que amplían de forma sustancial las prestaciones y las áreas de aplicación de estos extractantes denominados disolventes supramoleculares.

• Extracción con hemimicelas y admicelas. Estos agregados moleculares se han utilizado durante algún tiempo para la extracción en fase sólida de metales pesados en muestras acuosas. Para ello, el metal forma complejos con agentes quelatantes, previamente adsorbidos en las hemimicelas o admicelas,⁽⁷⁰⁻⁷²⁾ o se forma el quelato en la disolución acuosa como un paso previo a la adsorbilización.⁽⁷³⁾ Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado las excelentes prestaciones de estos agregados para la SPE de contaminantes orgánicos en muestras acuosas ambientales.⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾

3.3. Propiedades de los agregados moleculares

Los agregados moleculares presentan un conjunto de características de gran relevancia para su aplicación en procesos de extracción. Entre estas características, destacan las siguientes:

• *Se generan mediante fenómenos de autoensamblaje que están al alcance de cualquier laboratorio.* El autoensamblaje es un proceso en el que se produce la unión espontánea de componentes moleculares, nanoscópicos o macroscópicos en agregados perfectamente estructurados, estables y unidos mediante interacciones no covalentes.⁽⁷⁶⁾ El autoensamblaje molecular es un proceso omnipresente en química, en la ciencia de los materiales y en biología, a pesar de que solo recientemente se ha convertido en un campo de estudio con entidad propia y una nueva estrategia de síntesis.⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾

[68] Bezerra, M.; Arruda, M.A.; Ferreira, S.L. *Applied Spectrosc. Reviews* 40 (2005) 269

[69] Stalikas, C.D. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 343

[70] Hiraide, M.; Iwasawa, J.; Kawaguchi, H. *Talanta* 44 (1997) 231

[71] Manzoori, J.L.; Sorouraddin, M.H.; Shabani, A.M.H.J. *Anal. Atomic Spectrometry* 13 (1998) 305

[72] Manzoori, J.L.; Sorouraddin, M.H.; Shabani, A.M.H. *Microchem. J.* 63 (1999) 295

[73] Hiraide, M.; Hori, J. *Anal. Sci.* 15 (1999) 1055

[74] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799

[75] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878

[76] Atwood, J.L.; Steed, J.W. (Eds.) *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker (2004) New York

[77] Lehn J.M., Ball P. *New Chemistry*, Ed. Hall, N. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.) (2000) pp. 300

[78] Philip, D.; Stoddart, J.F. *Angew.Chem. Int. Ed. Eng.* 35 (1996) 1155

• *Están formados por moléculas anfifílicas que son ubicuas en la naturaleza y en la síntesis química.* El número de estructuras disponibles es muy elevado, lo que permite seleccionar la más adecuada para la aplicación de interés. Se pueden obtener agregados a la carta variando el grupo polar o la cadena hidrocarbonada del compuesto anfifílico que lo constituye. La mayoría de estas moléculas son biodegradables y el coste suele ser bajo.

• *Tienen estructura tridimensional y presentan regiones de diferente polaridad* que muestran excelente capacidad de solvatación para una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos.

• *Poseen capacidad para actuar como multiligandos* debido a la presencia de múltiples grupos polares en el agregado.

• *Tienen baja volatilidad e inflamabilidad,* lo que hace que los procesos de extracción sean menos contaminantes y más seguros.

• *La mayoría de los agregados son compatibles con los sistemas de separación y detección usados en los procesos analíticos.*

• *Estabilizan los compuestos solubilizados* lo cual se ha aprovechado para simplificar e integrar los procesos de toma de muestra, transporte, conservación, extracción y concentración de contaminantes químicos en el medioambiente.⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾

3.4. Hemimicelas y admicelas

3.4.1. Descripción

Los tensioactivos iónicos se adsorben sobre la superficie de óxidos minerales con carga opuesta, tales como alúmina, sílice, dióxido de titanio e hidróxidos férricos, formando agregados supramoleculares que se denominan hemimicelas y admicelas. Estos agregados tienen la capacidad de solubilizar solutos mediante un proceso denominado adsolubilización. Hemimicelas y admicelas se han propuesto como adsorbentes en SPE y se han utilizado para la extracción/preconcentración de una

[79] Luque, N.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. J. *Chromatogr. A* 1094 (2005) 17

[80] Luque N.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 181

gran variedad de contaminantes presentes en matrices ambientales complejas.^(74-75,81-84) Para poder utilizar este tipo de adsorbentes en SPE es necesario conocer las isothermas de adsorción del correspondiente tensioactivo sobre el óxido adecuado en las condiciones experimentales en las que se va a llevar a cabo la extracción, por lo que son numerosos los estudios que se han llevado a cabo para determinar dichas isothermas.⁽⁸⁵⁻⁹⁰⁾ De acuerdo a la naturaleza de la superficie del óxido se distinguen dos tipos de isothermas:

1. De *carga constante*. La adsorción del tensioactivo se produce sin protonación o desprotonación del óxido mineral (Figura 2a).

2. De *potencial constante*. La adsorción del tensioactivo induce la protonación o desprotonación de la superficie del óxido (Figura 2b). La Figura 3 muestra, a modo de ejemplo, cómo la adsorción de un tensioactivo catiónico (Cloruro de dodecilpiridinio, DPC) induce la desprotonación de la superficie de la sílice incrementando así su densidad de carga superficial a un valor de pH dado; y en consecuencia favoreciendo la adsorción de más moléculas de tensioactivo.⁽⁸⁷⁾

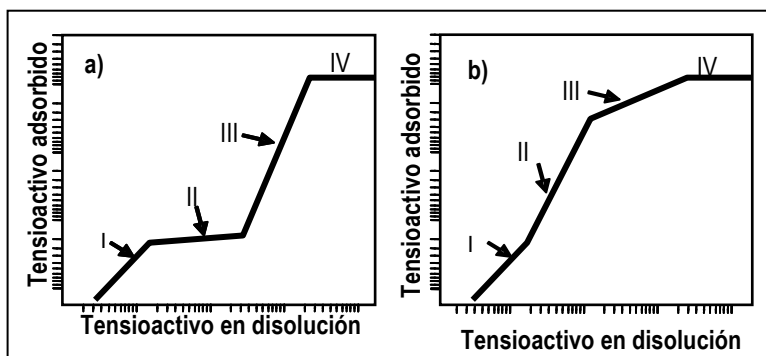


Figura 2: Isothermas de adsorción de tensioactivos iónicos sobre (a) superficies de carga constante y (b) superficies de potencial constante

- [81] Cantero, M.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005)161
[82] García-Prieto, A.; Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Analyst* 131 (2006) 407
[83] Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Analyst* 131 (2006) 835
[84] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1100 (2005) 8
[85] Bohmer, M.R.; Koopal, L.K.; *Langmuir* 8 (1992) 2649
[86] Bohmer, M.R.; Koopal, L.K.; *Langmuir* 8 (1992) 2660
[87] Goloub, T.P.; Koopal, L.K.; Bijsterbosch, B.H.; Sidorova, M.P. *Langmuir* 12 (1996) 3188
[88] Koopal, L.M.; Lee, E.M.; Bohmer, M.R. *J. Colloid Interf. Sci.* 170 (1995) 85
[89] Valsaraj, K.T. *Sep.Sci.Technol.* 24 (1989) 1191
[90] Valsaraj, K.T. *Sep.Sci.Technol.* 27 (1992) 1633

Como puede observarse, estas isothermas se dividen en cuatro regiones bien diferenciadas cuando se representa, en una escala logarítmica, la cantidad de tensioactivo adsorbido en función de la cantidad de tensioactivo en disolución (Figura 2).

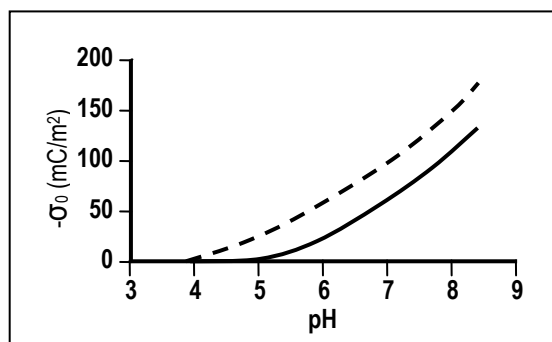


Figura 3: Curvas pH-carga de la sílice (Aerosil OX 50) en ausencia (—) y presencia (- -) de 0,02 M de DPC (KCl 0.01 M)

En la región I, denominada región de Henry, los grupos cabeza de los monómeros de tensioactivo interactúan electrostáticamente con la superficie del óxido mineral. La adsorción de las moléculas de tensioactivo ocurre de forma aislada, sin ningún tipo de interacción entre los monómeros adsorbidos (Figura 4). La formación de hemimicelas se inicia cuando se alcanza la concentración hemimicelar crítica (CHC). La adsorción de tensioactivo en la región hemimicelar se produce por interacciones electrostáticas con la superficie del óxido e interacciones laterales entre las cadenas hidrocarbonadas produciendo una monocapa con estructuras de agregación típicas (Figura 4), denominadas “teepee” en la terminología anglosajona. Si la superficie es de carga constante (Figura 2a), la pendiente de la isoterma es menor a la producida en la región I, ya que al aumentar la adsorción del tensioactivo se produce la progresiva neutralización de la carga superficial, disminuyendo la atracción electrostática. Para superficies de potencial constante (Figura 2b), la carga superficial no se compensa por la adsorción de moléculas aisladas de tensioactivo, sino que se generan nuevas cargas a medida que se produce la adsorción. Como resultado, la pendiente de la isoterma de la adsorción en la región II no disminuye, sino que aumenta, respecto a la región I.

La región III comienza cuando se produce la saturación de los centros activos del óxido por el tensioactivo adsorbido. En esta región, la adsorción del tensioactivo se debe exclusivamente a las interacciones hidrófobas entre las cadenas hidrocarbonadas produciéndose agregados denominados admicelas. Una vez alcanzada la carga máxima de tensioactivo sobre el óxido mineral, la adición de tensioactivo al sistema producirá el aumento de la concentración del mismo en disolución hasta alcanzar la concentración micelar crítica (cmc), a partir de la cual se forman micelas en disolución. En la Tabla 2 se muestran algunos de los sistemas óxido mineral-tensioactivo cuyas isotermas son similares a la descrita.⁽⁹¹⁾

La formación de hemimicelas y admicelas sobre la superficie de un óxido mineral está influenciada por los mismos parámetros que afectan a la formación de micelas en disoluciones acuosas. Así, los parámetros que afectan a la concentración micelar crítica (cmc) tales como la presencia de electrolito, la longitud y el grado de ramificación de la cadena hidrocarbonada de la molécula de tensioactivo, la presencia de aditivos de naturaleza orgánica, etc., también modifican la concentración hemimicelar crítica (chc) y el punto de transición entre las regiones III y IV de la isoterma de adsorción.⁽⁹²⁾

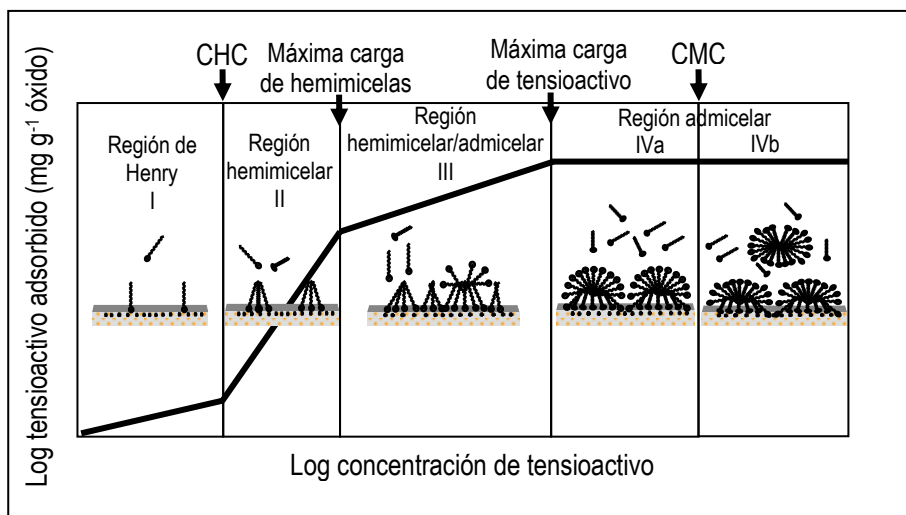


Figura 4: Representación esquemática de una isoterma de adsorción típica de cuatro regiones y estructuras propuestas para los diferentes agregados formados

[91] Paria, S.; Khilar, K.C. *Adv. Colloid Interfac.* 110 (2004) 75

[92] Bitting, D.; Harwell, J.H. *Langmuir* 3 (1987) 531

Tabla 2. Diferentes sistemas tensioactivo-adsorbente que generan una típica isoterma de adsorción de cuatro regiones

Tensioactivo	Adsorbente	Tensioactivo	Adsorbente
Dodecilsulfonato sódico	Alúmina	Dodecilsulfato sódico	Alúmina
Alquilbenceno sulfonato	Alúmina	Igepal Co-660	Sílice pirogénica
Cloruro de tetradecilpiridinio	Gel de sílice	Cloruro de dodecilpiridinio	Rutilo
Bromuro de tetradecilpiridinio	Gel de sílice	p-3 nonilbencenosulfonato sódico	Rutilo
Bromuro de dodecilpiridinio	Gel de sílice	4-C ₁₁ paraxilenosulfonato	Alúmina

Factores que influyen en la adsorción de tensioactivo sobre el óxido mineral

El pH es uno de los parámetros más importantes ya que determina la densidad de carga superficial del óxido mineral y por tanto la cantidad de tensioactivo que puede adsorberse. Los óxidos minerales más usados, alúmina y sílice, tienen punto de carga cero (pcz) a valores de pH alrededor de 9 y 3, respectivamente. Por tanto, la alúmina se usa a valores de pH ácidos para la adsorción de tensioactivos aniónicos y la sílice a valores de pH neutros o ligeramente básicos para la adsorción de tensioactivos catiónicos. En la Figura 3 puede observarse cómo la densidad de carga de la sílice aumenta a medida que aumenta el pH, es decir a medida que el pH se aleja del pcz.⁽⁸⁷⁾

Con relación a la cadena hidrocarbonada, cuanto mayor es su longitud, más hidrófoba es la molécula y mayor es su facilidad para formar agregados, con la consiguiente disminución de la CMC o CHC. Un incremento de un grupo -CH₂- en la cadena hidrocarbonada del tensioactivo produce una disminución de la CMC y CHC de tres veces (regla de Traube).⁽⁹³⁾

En cuanto a la influencia de la presencia de electrolito y tipo de contraión del tensioactivo sobre la adsorción del mismo, la Tabla 3 muestra como ejemplo los

[93] Fan, A.; Somasundaran, P.; Turro, N.J. *Langmuir* 13 (1997) 506

resultados obtenidos en los estudios realizados por Velegol y Tilton⁽⁹⁴⁾ utilizando cetiltrimetilamonio (CTA+) y sílice. Como puede observarse, la cantidad adsorbida de CTA+ es mayor en presencia de electrolito. Por otro lado, además de a la adsorción, el contraíón también puede afectar a la morfología del agregado, pasando de ser esférico a cilíndrico. Así, cuando disminuye la interacción del contraíón con las moléculas de agua (caso del ión bromuro frente al cloruro), éste tiende a asociarse más con las moléculas del tensioactivo que constituyen el agregado, lo cual reduce las fuerzas repulsivas entre los grupos de cabeza permitiendo la formación de agregados cilíndricos menos curvados.

La temperatura afecta de forma negativa a la cantidad máxima de tensioactivo que puede adsorberse sobre el óxido mineral. La disminución en la cantidad máxima de tensioactivo adsorbida se debe al aumento de la energía cinética de las especies y por lo tanto hay un aumento de la entropía del sistema que causa una reducción de la organización de los agregados en la superficie del adsorbente.⁽⁹¹⁾

Tabla 3. Cantidad máxima de CTA+ adsorbida en función del contraíón del tensioactivo y la presencia de electrolito

Contraíón	Cantidad máxima adsorbida (mg m ⁻²)	
	En ausencia de electrolito	En presencia de KCl 10 mM
Cloruro	0.9±0.1	1.2±0.2
Bromuro	1.7±0.2	2.1±0.2
p-toluenosulfonato	2.7±0.1	2.9±0.3

3.4.2. Mecanismos de adsolubilización de los analitos

El fenómeno de adsolubilización de compuestos orgánicos sobre hemimicelas y admicelas presenta un gran potencial para extracción en fase sólida. Los agregados de tensioactivos poseen estructura tridimensional con diferentes microambientes donde analitos de muy diversa polaridad y carga pueden solubilizarse. Las interacciones que pueden ofrecer son muy variadas dependiendo de las características del grupo polar del tensioactivo y del tipo de agregado seleccionado.

[94] Velegol, S.V.; Tilton, R.D. *J. Colloid Interf. Sci.* 249 (2002) 282

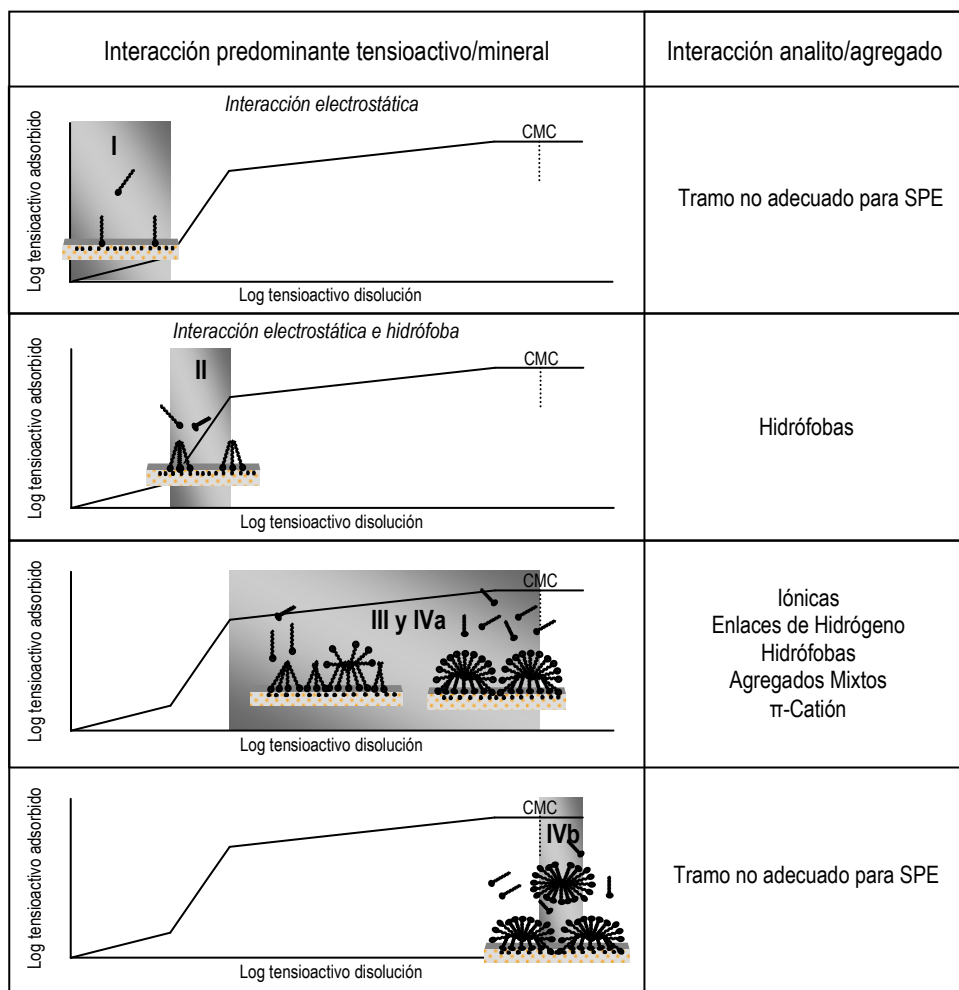


Figura 5. Mecanismo de adsorción del tensioactivo sobre el óxido mineral y de adsolubilización de solutos sobre los agregados formados en las distintas regiones de la isoterma de adsorción

De las cuatro regiones en las que se divide una isoterma, no todas son adecuadas para su utilización en SPE. Las regiones útiles son aquellas en las que hemimicelas y admicelas están en equilibrio con monómeros en disolución. Así, la región I (Figura 5), donde el mecanismo de adsorción de tensioactivo sobre el óxido mineral se debe a interacciones meramente electrostáticas, no es apta para SPE puesto que no se forma ningún tipo de agregado donde los analitos puedan solubilizarse.

En la región II o hemimicelar (Figura 5) los analitos pueden solubilizarse en el adsorbente mediante interacciones hidrófobas con la cadena hidrocarbonada del tensioactivo. Las regiones III (constituidas por hemimicelas y admicelas) y IVa (admicelas) son las que ofrecen mayores posibilidades en SPE puesto que la superficie exterior es polar o iónica y el tipo de interacción puede modificarse mediante selección del tensioactivo. En estas regiones pueden adsolubilizarse analitos de muy diferente polaridad, ya que pueden producirse enlaces por puente de hidrógeno, interacciones iónicas, de Van der Waals o π -catión y formación de agregados mixtos (cuando los analitos presentan carácter anfifílico). Así, se podría lograr la retención simultánea de analitos con muy diferente polaridad, siendo esta característica muy importante en monitorización medioambiental.

Cuando la concentración de tensioactivo en disolución alcanza la CMC, región IVb, (Figura 5), comienzan a formarse micelas y en este caso la retención de los analitos sobre el adsorbente no es cuantitativa ya que estos se distribuyen entre el adsorbente y las micelas en disolución. Por consiguiente, esta región de la isoterma no es apta para SPE.

3.4.3. Modo de operación

Un aspecto importante a considerar cuando se trabaja con hemimicelas y/o admicelas como adsorbente en SPE es que la adsorción del tensioactivo sobre el óxido mineral es un proceso dinámico, por lo que estos agregados se encuentran en equilibrio con moléculas de tensioactivo en disolución. Por tanto, durante la percolación de la muestra a través del adsorbente se producirá una pérdida progresiva de tensioactivo, lo cual modificará la cantidad y las características de la fase adsorbente usada. Si se trabaja en la región hemimicelar, la concentración en disolución es del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ y la pérdida de tensioactivo durante la percolación de la muestra es despreciable, por lo que no es necesario aportar una cantidad adicional de tensioactivo a la muestra. Sin embargo, la concentración de tensioactivo en disolución en las regiones donde se producen admicelas es del orden de mg L^{-1} , y por tanto si estos agregados se usan en SPE es fundamental añadir a la muestra la concentración adecuada de tensioactivo, para mantener constante la cantidad de tensioactivo adsorbido. El modo de operación cuando se trabaja en extracción en fase sólida con hemimicelas/admicelas es similar a la extracción en fase sólida convencional (Figura 6):

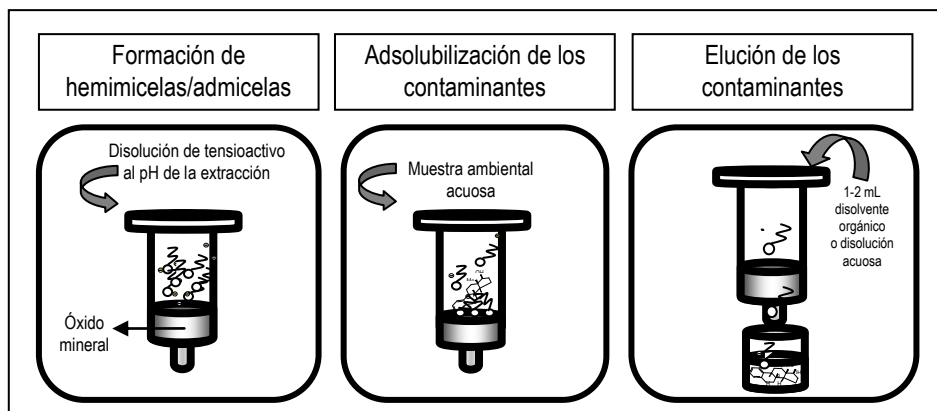


Figura 6. Modo de operación cuando se usan hemimicelas y/o admicelas como adsorbente en SPE

En primer lugar se procede a la formación de hemimicelas y/o admicelas pasando una disolución del tensioactivo seleccionado, al pH al que se llevará a cabo la extracción, a través del óxido mineral.

A continuación se procede a la percolación de la muestra de manera que se produce la adsorbilización de los analitos (retención). Hay que tener presente el tipo de agregado con el que se trabaja, pues según se acaba de mencionar, si se trabaja en la zona admicelar hay que añadir a la muestra la concentración adecuada de tensioactivo, para mantener constante la cantidad adsorbida del mismo.

Finalmente, los analitos se eluyen con 1-2 mL de disolvente orgánico o disoluciones acuosas a un valor de pH adecuado para romper las interacciones tensioactivo-óxido mineral.

3.5. Materiales mesoporosos

3.5.1. Descripción

Los materiales mesoporosos son estructuras ordenadas con tamaños de poro uniformes en el intervalo comprendido entre 20 y 100 Å. Su descubrimiento en el año 1992 por investigadores de la empresa Mobil⁽⁹⁵⁻⁹⁶⁾ constituye uno de los hallazgos más importantes en el campo de los nuevos materiales en los últimos años.

[95] Kresge, C.T.; Leonowicz, M.E.; Roth, W.J.; Vartuli, J.C.; Beck, J.S. *Nature* 359 (1992) 710

Los agentes estructurantes en los materiales mesoporosos son agregados de tensioactivos que en presencia de un precursor inorgánico forman inicialmente un material híbrido. Los materiales híbridos constituyen un paso intermedio fundamental para la síntesis de los materiales mesoporosos, los cuales se obtienen eliminando la matriz orgánica (tensioactivo) del substrato inorgánico. En la Figura 7 se muestra un esquema de las principales etapas en un proceso de síntesis de un silicato mesoporoso

Los materiales mesoporosos tienen propiedades muy atractivas para procesos de adsorción debido a su elevada área superficial, que puede llegar hasta $1600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, y la disposición regular de los canales que los constituyen y que imitan al agente estructurante utilizado durante el proceso de síntesis.

En la última década han existido avances espectaculares en la síntesis y caracterización de los materiales mesoporosos.⁽⁹⁷⁾ En la actualidad, la comunidad científica ha centrado su atención en las numerosas aplicaciones que pueden derivarse de los mismos.⁽⁹⁸⁾

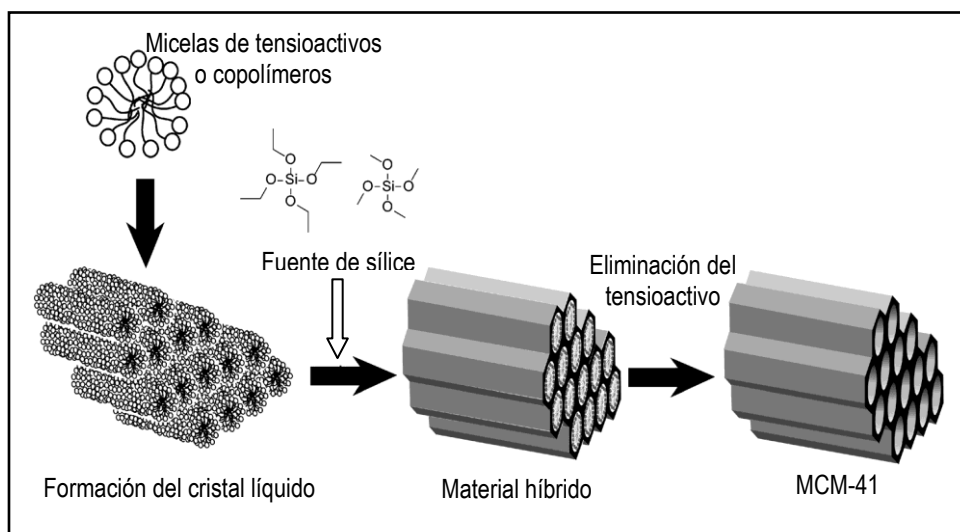


Figura 7: Representación esquemática de la síntesis de un material mesoporoso (MCM-41)

[96] Beck, J.S.; Vartuli, J.C.; Roth, W.J.; Leonowicz, M.E.; Kresge, C.T.; Schmitt, K.D.; Chu, C.T.-W.; Olson, D.H.; Sheppard, E.W.; McCullen, S.B.; Higgins, J.B.; Schlenker, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834

[97] Bonneviot, L.; Giasson, S.; Kaliaguine, S.; Stocker, M. *Microporous Mesoporous Mater.* 44 (2001) ix

[98] Cielsa, U.; Schüth, F. *Microporous Mesoporous Mater.* 27 (1999) 131

3.5.2. Tipos de silicatos mesoporosos

La preparación de silicatos mesoporosos requiere al menos tres ingredientes: una fuente de sílice, una molécula anfífila y un disolvente (generalmente agua). En algunas ocasiones se emplean reactivos adicionales tales como ácidos, bases, sales, determinadas moléculas para expandir la estructura y co-solventes. Una vez que se ha formado el sólido bajo las condiciones de síntesis adecuadas, la molécula anfífila se elimina mediante calcinación, extracción con disolvente, etc dando lugar al silicato mesoporoso. Se han descrito tres rutas sintéticas básicas que generan tres tipos de materiales mesoporosos (Tabla 4).

La primera ruta implica el uso de tensioactivos iónicos. Si el agente estructurante es un tensioactivo catiónico,⁽⁹⁵⁻⁹⁶⁾ la síntesis puede llevarse a cabo en medio básico, en cuyo caso sigue un mecanismo de ensamblaje iónico puro, representado esquemáticamente como S^+I^- , (donde S representa al tensioactivo e I al precursor inorgánico) o en medio ácido, donde es necesaria la participación de un contraión según el modelo $S^+X^-I^+$ (X^- es Cl^- o Br^-). La familia de sólidos silíceos M41S, formada por el MCM-41 de estructura hexagonal, el MCM-48 de estructura cúbica y el MCM-50 de estructura laminar, constituyen el ejemplo más paradigmático de los productos obtenidos mediante este tipo de síntesis (Figura 8).

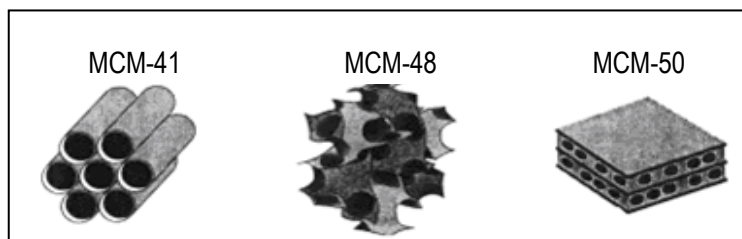


Figura 8: Familia de materiales mesoporosos M41S

Cuando el agente estructurante es un tensioactivo aniónico (S^-I^+)⁽⁹⁹⁾ se producen silicatos mesoporosos denominados AMS, con diámetros de poro entre 20 y 60 Å entre los que se encuentra el AMS-1 (hexagonal tridimensional), el AMS-2 (cúbico tridimensional), el AMS-3 (hexagonal bidimensional) y el AMS-4 (cúbico tridimensional bicontinuo).

[99] Che, S.; García-Bennett, A.E.; Yokoi, T.; Sakamoto, K.; Kunieda, H.; Teresaki, O.; Tatsumi, T. *Nature Mater.* 2 (2003) 801

Tabla 4: Tipos de sólidos mesoporosos silíceos obtenidos por agentes estructurantes supramoleculares

Tipos de silicatos mesoporosos	Símbolo (significado)	Mesoestructura y simetría
	(Mobil Composition of Matter)	
	MCM-41	Hexagonal ($p6mm$)
	MCM-48	Cúbica ($Ia3d$ (S^+)) ($Pm3n$ (S^+X^+))
	MCM-50	Lamelar (L_g)
Mesoporosos con estructura ordenada (directores de estructura: agregados de tensioactivos iónicos)	(Anionic templated Mesoporous Silica)	Hexagonal
	AMS-1	Cúbica ($Pm3n$)
	AMS-2	Hexagonal ($p6mm$)
	AMS-3	Cúbica
	AMS-4	Lamelar
	AMS-5	
Mesoporosos con estructura desordenada (directores de estructura: agregados de tensioactivos no iónicos)	(Michigan State University)	
	MSU-X	Hexagonal
	(University of California at Santa Barbara)	
Mesoporosos con estructura desordenada (directores de estructura: copolímeros neutros)	SBA-15	Hexagonal ($p6mm$)
	SBA-12	Hexagonal ($p63/mmc$)
	SBA-16	Cúbica ($Ia3d$)
	SBA-1	Cúbica ($pm3n$)

La segunda ruta de síntesis, introducida por el grupo de Pinnavaia,⁽¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾ está basada en la formación de puentes de hidrógeno entre agregados de tensioactivos no iónicos y oligómeros silíceos neutros (S^0I^0). Estos sólidos se denominan genéricamente MSU-X y se caracterizan por un empaquetamiento irregular de los canales en su estructura. Sin embargo, exhiben un diámetro de poro uniforme como los materiales de la familia M41S, aunque las paredes de los poros

[100] Bagshaw, S.A.; Prouzet, E.; Pinnavaia, T.J.; *Science* 269 (1995) 1242

[101] Prouzet, E.; Pinnavaia, T.J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1995) 516

son más delgadas y presentan mayor grado de condensación, lo que les confiere mayor estabilidad térmica.

Por último, la tercera ruta de síntesis supone el empleo de copolímeros de dos y tres bloques como agentes estructurantes⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾ y sigue el mecanismo S⁺X-I. Las estructuras ordenadas obtenidas, genéricamente denominadas SBA, son hexagonales o cúbicas presentan tamaños de poro que pueden llegar hasta 500 Å. El espesor de las paredes de estos poros varía entre 30 y 90 Å, lo que hace que los materiales SBA sean térmicamente más estables. Los copolímeros interactúan débilmente con la superficie inorgánica por lo que su eliminación tras la síntesis es más fácil que en el caso de los tensioactivos iónicos.

Se ha realizado un gran esfuerzo para elucidar el mecanismo de formación de los materiales mesoporosos silíceos, tanto para la síntesis basadas en interacciones electrostáticas^(95-96,105-110) como las dirigidas por enlaces de puentes de hidrógeno.^(100,111-112)

3.5.3 Características de los materiales mesoporosos relevantes en procesos de adsorción

El conocimiento detallado de las características estructurales, superficiales y operacionales de los silicatos mesoporosos es fundamental para predecir su comportamiento en procesos de adsorción.

Características estructurales

Dada la elevada porosidad de los silicatos mesoporosos, es fundamental conocer el tamaño de poro de los mismos y su accesibilidad para las moléculas de

[102] Zhao, D.; Feng, J.; Hou, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G.H.; Chmelka, B.F.; Stucky, G.D. *Science* 279 (1995) 548

[103] Zhao, D.; Hou, Q.; Feng, J.; Chmelka, B.F.; Stucky, G.D. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024

[104] Yu, C.; Yu, Y.; Miao, L.; Zhao, D. *Microporous Mesoporous Mater.* 44 (2001) 65

[105] Vartuli, J.C.; Kresge, C.T.; Leonowicz, M.E.; McCullen, S.B.; Johnson, I.D.; Shepard, E.W. *Chem. Mater.* 6 (1994) 2070.

[106] Beck, J.S.; Vartuli, J.C.; Kennedy, G.J.; Kresge, C.T.; Roth, W.J.; Schramm, S.E. *Chem. Mater.* 6 (1994) 1816

[107] Cheng, C.F.; Luan, Z.; Klinowski, J. *Langmuir* 11 (1995) 2815

[108] Beck, J.S.; Vartuli, J.C. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 1 (1996) 76

[109] Hou, Q.; Margolese, D.I.; Cielsa, U.; Feng, P.; Gier, T.E.; Sieger, P.; Leon, R.; Petroff, P.M.; Schüth, F.; Stucky, G.D. *Nature* 368 (1994) 317

[110] Huo, Q.; Margolese, D.I.; Cielsa, U.; Demuth, D.G.; Feng, P.; Gier, T.E.; Sieger, P.; Firouzi, A.; Chmelka, B.; Schüth, F.; Stucky, G.D. *Chem. Mater.* 6 (1994) 1176

[111] Tanev, P.T.; Pinnavaia, T.J. *Science* 267 (1995) 865

[112] Tanev, P.T.; Pinnavaia, T.J. *Chem. Mater.* 8 (1996) 2068

interés con objeto de predecir fenómenos de exclusión por tamaño y/o velocidades de transferencia de masa. La accesibilidad a los poros de los sólidos tridimensionales tales como el MCM-48 es mayor que para las estructuras unidireccionales, como los MCM-41 y SBA-15, que tienen poros largos pero no interconectados entre sí lo que impone serias limitaciones a la transferencia de masa en las partes menos accesibles de los canales. La accesibilidad se facilita en estructuras como la de los sólidos MSU-X, que tienen poros altamente interconectados y de pequeña longitud lo que permite velocidades altas de difusión de los analitos en la red de canales que lo conforman.

La estructura de los sólidos mesoporosos está determinada por el tipo de agregado de tensioactivo utilizado como agente estructurante, y este a su vez depende de las características geométricas del tensioactivo que lo constituye, concretamente, de la rigidez de la parte hidrófoba y del balance hidrófobo-hidrófilo que presente. La estructura supramolecular formada por un tensioactivo en disolución puede predecirse a través del parámetro crítico de empaquetamiento⁽¹¹³⁾ $g=V/aI$, donde V es el volumen ocupado por las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo (suponiendo que son fluidas e incompresibles), a es el área superficial media ocupada por cada grupo hidrófilo en los agregados, y I es la longitud máxima efectiva de las cadenas hidrófobas, llamada longitud crítica (Figura 9). En la Tabla 5 se muestran los tipos de agregados de tensioactivos que se formarán dependiendo del valor del parámetro crítico de empaquetamiento así como la morfología de los correspondientes sólidos mesoporosos formados a partir de estos agregados.⁽⁹⁸⁾

Otra variable crítica en la formación de mesoestructuras es la relación tensioactivo/sílice, de forma que se pueden obtener productos con diferentes morfologías según se requiera, tomando como base esta relación.⁽¹¹⁴⁻¹¹⁵⁾

En relación al tamaño de poro, este generalmente se modifica cambiando la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo usado en la síntesis o bien añadiendo moléculas como el 1,3,5-tri-metilbenceno⁽¹¹⁶⁾ o hidrocarburos lineales⁽¹¹⁷⁾ que se disuelven en la región hidrófoba de las micelas incrementando su tamaño.

[113] Israelachvili, J.N.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* (1976) 1525

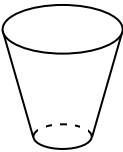
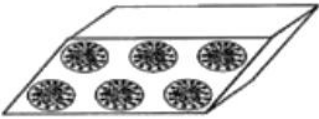
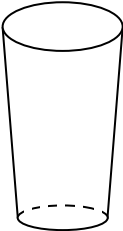
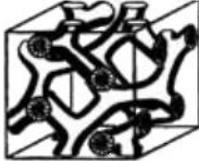


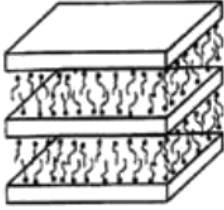
[114] Vartuli, J.C.; Schmitt, K.D.; Kresge, C.T.; Roth, W.J.; Leonowicz, M.E.; McCullen, S.B.; Hellring, S.D.; Beck, J.S.; Schlenker, J.L.; Olson, D.H.; Sheppard, E.W. *Chem. Mater.* 6 (1994) 2317

[115] Behrens, P.; Glaue, A.; Haggemüller, C.; Schechener, G. *Solid State Ionics* 101-103 (1997) 271

[116] Favoriti, P.; Monticone, V.; Treiner, C. *J. Colloid Interface Sci.* 179 (1996) 173

[117] Ulagappan, N.; Rao, C.N.R. *Chem. Commun.* (1996) 2759

Tabla 5: Relación entre el parámetro crítico de empaquetamiento, la geometría del tensioactivo y la morfología del sólido formado

Parámetro crítico de empaquetamiento	Geometría adoptada por el tensioactivo	Estructura formada	Morfología sólido mesoporoso (ejemplos)
1/3-1/2	Cono truncado 	Micelas cilíndricas	Hexagonal  MCM-41; AMS-1; AMS-3; MSU-X; SBA-15; SBA-12
1/2-1	Cono truncado 	Bicapas flexibles (vesículas)	Cúbica   MCM-48; AMS-2; AMS-4; SBA-16; SBA-1
≈ 1	Cilindro 	Bicapas planas	Lamelar  AMS-5; MCM-50

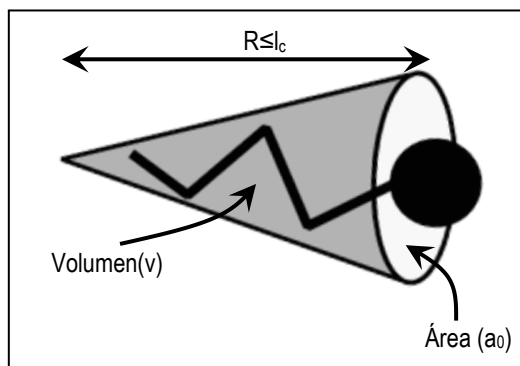


Figura 9: Parámetros geométricos de una molécula de tensioactivo

La naturaleza, concentración y reactividad de los grupos hidroxilo presentes en la superficie interna de los poros determina las propiedades de adsorción de los materiales mesoporosos ya que estos pueden enlazar moléculas a través de puentes de hidrógeno o bien pueden usarse como centros activos para la introducción de grupos funcionales.

Características superficiales

Las propiedades de la superficie interna de los poros se ha estudiado mediante la adsorción de moléculas polares y no polares y mediante una gran variedad de técnicas incluyendo resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de infrarrojos con transformadas de Fourier (FTIR) y gravimetría térmica/análisis térmico diferencial.^(96,118) Los resultados de estos estudios han revelado que la superficie interna del MCM-41 y MCM-48 son hidrofílicas y que entre el 26 y el 30% de los átomos de silicio portan grupos OH, distinguiéndose al menos tres tipos diferentes de grupos silanoles:⁽¹¹⁹⁾ simples, enlazados por hidrógeno y grupos silanol germinales.

Los grupos silanol de las superficies internas experimentan deshidroxilación muy por debajo de 600°C. Por tanto, en el caso de los sólidos sintetizados electrostáticamente, el proceso de calcinación típicamente usado para eliminar el tensioactivo de la red estructural también eliminará los grupos hidroxilo

[118] Landmesser, H.; Kosslick, H.; Storek, W.; Fricke, R. *Solid State Ionics* 101-103 (1997) 271

[119] Zhao, X.S.; Lu, G.Q.; Whittaker, A.K.; Millar, G.J.; Zhu, H.Y. *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 6525

por lo que es necesario un proceso de rehidratación para su reconstitución.⁽¹¹⁸⁾ En los materiales mesoporosos sintetizados a través de rutas eléctricamente neutras, los tensioactivos se eliminan fácilmente mediante extracción con disolventes y este proceso no destruye los grupos hidroxilo.

La funcionalización de la superficie interna de los silicatos mesoporosos puede realizarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales. Se ha descrito la funcionalización de un gran número de grupos incluyendo aminas, cloruros, tioles, ácidos carboxílicos y fenilos.⁽¹²⁰⁻¹²⁵⁾

Características operacionales

Es bien conocido que los sólidos síliceos mesoporosos exhiben elevada estabilidad térmica, no afectándose su estructura hasta los 1000 K. Sin embargo, su estabilidad mecánica a altas presiones, lo cual es de interés para el acoplamiento de SPE con LC, se ha investigado en menor medida. Aunque se han detectado pérdidas graduales del orden estructural en algunos sólidos como MCM-4⁽¹²⁶⁾ a medida que aumenta la presión entre 100 y 480 MPa, no se han descrito problemas especiales de estabilidad mecánica en las separaciones cromatográficas desarrolladas hasta la fecha usando los sólidos mesoporosos síliceos.⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾

3.6. Coacervados

3.6.1. Descripción

La coacervación es un fenómeno descrito por los químicos holandeses Bungenberg de Jong y Kruyt en 1930. Ellos acuñaron el término coacervado, del latín “co” que significa “junto” y “acervus” que se refiere a un montón de cosas menudas. La investigación sobre coacervados a lo largo del siglo XX ha tenido

[120] Asefa, T.; MacLachlan, M.J.; Coombs, N.; Ozin, G.A.; *Nature* 420 (1999) 867

[121] Liu, A.M.; Hidajat, K.; Sawi, S.; Zhao, D.Y. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (2000) 145

[122] Price, P.M.; Clark, J.H.; Macquarrie, D.J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 101

[123] Stein, A.; Melde, B.J.; Schrodén, R.C. *Adv. Mater.* 12 (2000) 1403

[124] Bambrough, C.M.; Slade, R.C.T.; Williams, R.T. *Phys. Chem. Phys.* 2 (2000) 3499

[125] Yiu, H.H.P.; Wright, P.A.; Botting, N.P. *J. Mol. Catal. B* 15 (2001) 81

[126] Bai, N.; Chi, Y.; Zou, Y.; Pang, W. *Mater. Letters* 54 (2002) 37

[127] Grün, M.; Kurganov, A.A.; Schacht, S.; Schüt, F.; Unger, K.K. *J. Chromatogr. A* 740 (1996) 1

[128] Nakamishi, K.; Takahashi, R.; Nagakane, T.; Kitayama, K.; Koheiya, N.; Shikata, H.; Soga, N. *J. Sol.-Gel Sci. Technol.* 17 (2000) 191

[129] Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Soga, N.; Tanaka, N. *J. Sol.-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 163

grandes discontinuidades, con décadas de relativa inactividad hasta que a finales de los 70 el bioquímico ruso Oparin popularizó el fenómeno fuera del ámbito coloidal cuando propuso que la vida se inició en gotas de coacervados.⁽¹³⁰⁾ En la actualidad, la mayoría de la información que existe sobre los mismos se encuentra dispersa en investigaciones de interés en química coloidal, química de polímeros, físico-química, y en la industria farmacéutica y alimentaria.

Tabla 6: Tipos de macromoléculas que experimentan coacervación

Proteínas	Gelatina	Polisacáridos	Goma Arábica
	β -lactoglobulina		Pectina
Polímeros sintéticos	Caseína	Drogas	Quitósán
	Albúmina		Alginato
	Glicinina	Agregados moleculares	Gentamicina
	Acetato de polivinilo		Morfina
	Polivinilpirrolidona		Tensioactivos
Hidroxipropilcelulosa	Agregados moleculares	Tensioactivos	
Isobutileno-isopreno		Fosfolípidos	
Poli(dialquil)dimetilamonio		Sales biliares	
Heparina			

La IUPAC define la coacervación como un fenómeno que consiste en la separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas.⁽¹³¹⁾ A la fase más concentrada en el componente coloidal se le denomina coacervado; la otra fase tiene muy baja concentración en este componente y se denomina fase en equilibrio. Un coacervado es por definición inmiscible en su propio disolvente. Las estructuras macromoleculares que experimentan coacervación son muy variadas, tal como se muestra en la Tabla 6.

Los coacervados se han utilizado en múltiples aplicaciones (ej. purificación de proteínas, recuperación de acuíferos contaminados, tratamiento de aguas residuales, etc.), pero la aplicación de mayor interés a nivel industrial está relacionada con la tecnología de microencapsulamiento. Para la producción de las microcápsulas se usan macromoléculas de origen natural tales como proteínas y polisacáridos. Esta tecnología se ha empleado en gran extensión para la microencapsulación de ingredientes activos en áreas tales como farmacia, agricultura, alimentación y

[130] Oparin, A.I.; Gladiilin, K.L. *BioSyst.* 12 (1980) 133

[131] IUPAC *Compendium of Chemical Terminology* 31 (1972) 611

cosmética.⁽¹³²⁾ El fenómeno de la coacervación también se ha aplicado en procesos de extracción analítica. En este caso los coacervados se generan siempre a partir de agregados moleculares de tensioactivos.

3.6.2. Mecanismos y cinética de separación de fases

De acuerdo al mecanismo de separación de fases, se distinguen dos tipos de coacervación: simple y compleja.⁽¹³³⁻¹³⁴⁾

En coacervación simple, el componente coloidal es una macromolécula, neutra o cargada, disuelta en agua, o una macromolécula neutra disuelta en un disolvente orgánico. El agente que causa la coacervación puede ser un cambio en el pH o la temperatura, la adición de una determinada cantidad de electrolito, o la adición de un volumen de disolvente, miscible con el primero, pero en el que la macromolécula es poco soluble.

El mecanismo básico por el que se produce la separación de fases en coacervación simple es la desolvatación de la macromolécula.⁽¹³³⁾ En una suspensión coloidal, el disolvente interactúa con las macromoléculas a través de enlaces dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno y/o fuerzas de Van der Waals. Como resultado, el disolvente forma una capa alrededor de las macromoléculas que impide o limita la interacción entre las mismas. El agente inductor de la coacervación simple tiene como función destruir la interacción disolvente-macromolécula favoreciendo de este modo la interacción entre macromoléculas. Los agregados formados son insolubles y se separan del disolvente produciendo el coacervado.

La coacervación compleja⁽¹³⁴⁾ se produce cuando a disoluciones acuosas de macromoléculas cargadas se le adiciona una macromolécula de signo opuesto. En este tipo de coacervación el factor electrostático (densidad de carga de macromoléculas, fuerza iónica, etc.) es esencial para la formación del coacervado. Ahora bien, se deben cumplir una serie de condiciones para que se favorezca la coacervación frente a la precipitación. Así, la densidad de carga superficial no debe ser muy elevada y la distribución de la carga sobre los dos poliones no debe ser

[132] Gander, B.; Blanco-Prieto, M.J.; Thomasin, C.; Wandrey, C.; Hunkeler, D. *Coacervation/Phase Separation. In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J.; Boylan, J.C. (Eds.) Marcel Dekker (2002) New York

[133] Wang, Y.; Kimura, K.; Huang, Q.; Dubin, P.L.; Jaeger, W. *Macromolecules* 32 (1999) 7128

[134] Mohanty, B.; Bohidar, H.B. *Biomacromolecules* 4 (2003) 1080

complementaria, es decir el espaciado entre cargas debe ser asimétrico. Cuando se produce la interacción, el complejo resultante retiene contraiones y un grado considerable de moléculas de disolvente. La solvatación parcial del complejo es una de las razones por la que se obtienen coacervados en lugar de productos insolubles.

La coacervación es por naturaleza un proceso cinético.⁽¹³⁵⁾ Los modelos generales usados para describir la cinética de separación de fases son nucleación y crecimiento, y descomposición espinodal (Figura 10). En el primero se produce interacción entre macromoléculas cercanas que a continuación experimentan coalescencia hasta que alcanzan un determinado tamaño y se produce separación de fases (Figura 10a). A nivel macroscópico, el coacervado está generalmente constituido por gotas esféricas dispersas en una fase continua (Figura 11a). En el modelo de descomposición espinodal (Figura 10b) la interacción implica a muchas macromoléculas en la etapa inicial, produciendo a nivel macroscópico una red tridimensional interconectada, que se hace progresivamente más densa (Figura 11b).

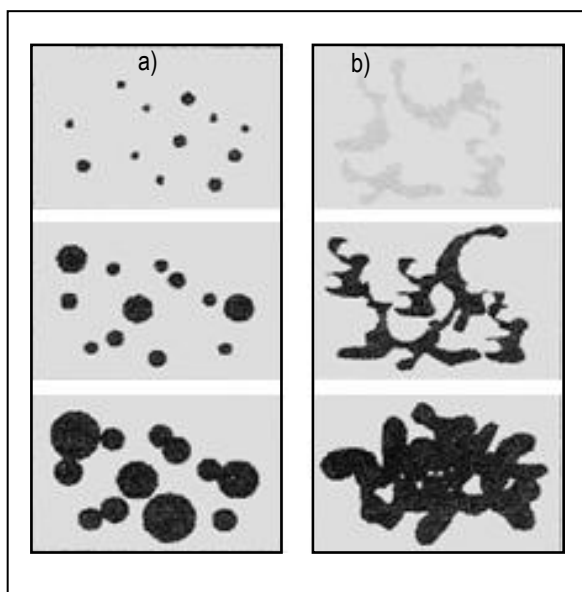


Figura 10. Cinéticas de separación de fases: a) modelo de nucleación y crecimiento b) modelo de descomposición espinodal

[135] Turgeon, S.L.; Beaulieu, M.; Schmitt, C.; Sánchez, C. *Current Opinión Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 401

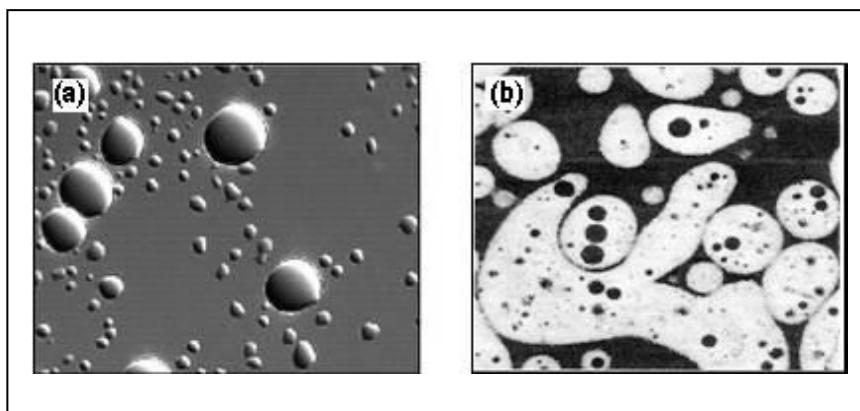


Figura 11. Coacervado compuesto por (a) ácido decanoico + tetrahidrofurano, estructura globular; (b) β -lactoglobulina+ goma arábica, estructura de red interconectada

3.6.3. Diagramas de fases

Para describir el comportamiento de sistemas en equilibrio donde se generan diferentes fases se recurre a los denominados diagramas de fases, que son representaciones gráficas donde se muestra el comportamiento del sistema en función de diferentes variables. Concretamente, en el proceso de coacervación es muy importante determinar los valores relativos (concentraciones, temperatura, etc.) de los componentes del sistema a los que ocurre la separación de fases con objeto de determinar los límites en los que se obtiene el coacervado.

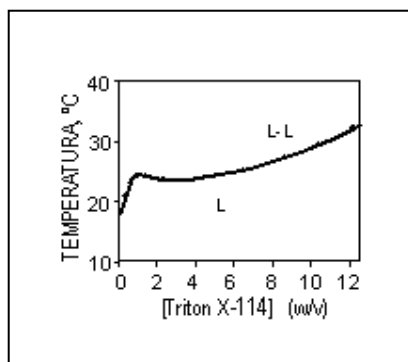


Figura 12. Diagrama de fases para el tensioactivo no iónico tritón X-114 en disolución acuosa

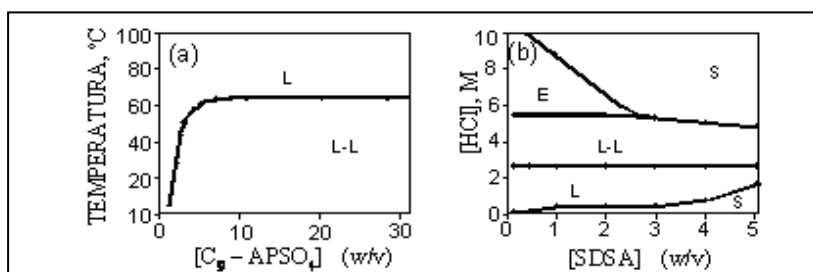


Figura 13. Diagrama de fases para los tensioactivos (a) 3-(nonildimetilamonio propil sulfato y (b) dodecano sulfonato sódico

Como se ha comentado con anterioridad el proceso de coacervación en química analítica se produce a partir de agregados moleculares de tensioactivos en presencia de un agente deshidratante (coacervación simple), por ello son necesarios al menos dos componentes para que se genere el coacervado. En la Figura 12 se muestra el diagrama de fases de una disolución acuosa de un tensioactivo no iónico (tritón X-114) en función de la temperatura, fenómeno al que tradicionalmente se ha denominado cloud point. La temperatura a la que ocurre este fenómeno se denomina punto de nube. La denominada curva de coexistencia separa dos regiones; en la región L el tensioactivo forma micelas acuosas, mientras en la región L-L coexisten dos fases: el coacervado, constituido por micelas acuosas de grandes dimensiones y la fase en equilibrio, donde el tensioactivo se encuentra en forma monomérica a la concentración micelar crítica.

El diagrama de fases de una disolución de agregados de tensioactivo que experimenta coacervación depende de la naturaleza del mismo y del agente coacervante. Así, los tensioactivos anfóteros, al contrario que los no iónicos, experimentan coacervación a bajas temperaturas. Como ejemplo, la Figura 13a muestra el diagrama de fases de un tensioactivo anfótero, C_9APSO_4 (3-(nonildimetilamonio propil sulfato) en disolución acuosa.⁽⁵³⁾

Las disoluciones de micelas aniónicas acuosa constituidas por alquil sulfatos, alquil sulfonatos y alquil sulfosucinatos, que experimentan coacervación inducida por ácidos a temperatura ambiente, presentan diagramas de fases más complejos.⁽¹³⁶⁻¹³⁷⁾ En la Figura 13b se muestra el diagrama de fases de micelas

[136] Casero, I.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519

[137] Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D.; Maniasso, N.; Zagatto, E.A.G. *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29

acuosas de dodecano sulfonato sódico, SDSA. En este caso se definen cuatro regiones en las que se observa: una fase líquida homogénea (L), la región de coacervación (L-L), una emulsión (E) y una región constituida por dos fases una de ellas líquida y la otra sólida (S).

En general, los diagramas de fases se modifican en presencia de aditivos tales como sales, disolventes orgánicos, etc. por lo que este hecho debe tenerse en cuenta en los procesos de extracción basados en fenómenos de coacervación. Así la adición de aditivos a una disolución acuosa de Tritón X-100 puede producir un aumento o una disminución de la temperatura del punto de nube (Tabla 7). Los tensioactivos anfóteros, por lo general, exhiben el comportamiento opuesto al observado en los no iónicos, es decir la adición de una sal provoca un aumento en la temperatura del punto de nube.

Tabla 7. Influencia de la presencia de aditivos en la temperatura de punto de nube del tensioactivo Tritón X-100

Aditivo	Temperatura de punto de nube (°C)
Ninguno	63.7
Urea 0.3 M	65.7
Urea 0.5 M	68.1
Azida sódica 2% (pH 7)	61.0
Cloruro sódico 0.5 M (pH 7)	26.0
Cloruro sódico 1.0 M (pH 7)	47.0

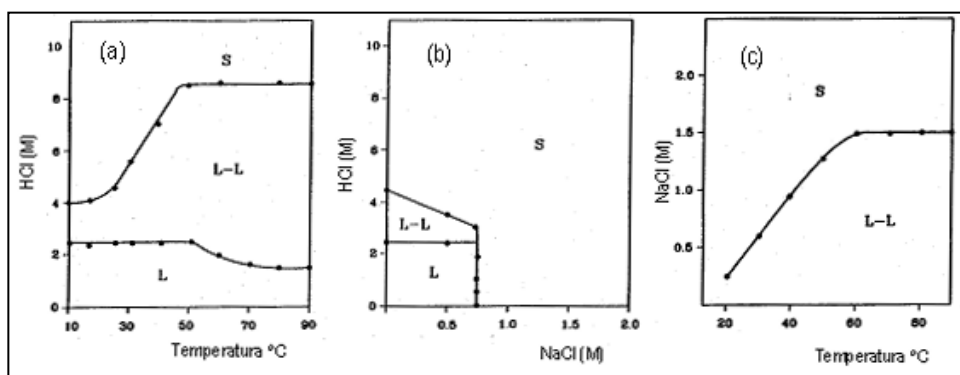


Figura 14. Diagramas de fases para SDS al 5% a) [HCl] frente a temperatura, b) [HCl] frente a [NaCl] y c) [NaCl] frente a temperatura en presencia de HCl 4 M

Los diagramas de fases de tensioactivos iónicos también pueden modificarse por la presencia de aditivos. Como ejemplo en la Figura 14 se muestran los diagramas de fases de disoluciones acuosas ácidas de sodio dodecilsulfato (SDS), a una concentración del 5% en función de la concentración de sal y la temperatura.

3.6.4. Mecanismos de solubilización/extracción de los analitos

La solubilización de analitos en las macromoléculas que forman el coacervado constituye la base de su aplicación en procesos de separación. Teniendo en cuenta que el coacervado está formado por agregados tridimensionales de sustancias anfifílicas, estos presentan diferentes regiones donde se pueden solubilizar analitos de muy diferente polaridad y carga. Así, los analitos hidrófobos se solubilizarán en la región hidrocarbonada de las macromoléculas que conforman el coacervado debido exclusivamente a interacciones hidrófobas mientras los analitos iónicos y polares se solubilizarán en la región polar a través de diferentes interacciones iónicas, π -catión, enlaces por puentes de hidrógeno, etc. Por otro lado, los solutos con carácter anfifílico formarán agregados mixtos con el coacervado mediante interacciones con los grupos polares e hidrófobos de los tensioactivos que las constituyen.

No existe uniformidad en la bibliografía acerca de la definición del coeficiente de partición o de la constante de equilibrio que puede usarse para representar la solubilización de los componentes de una disolución en sistemas supramoleculares.⁽⁶²⁾

Para aplicaciones analíticas, uno de los procedimientos más comunes ha sido calcular un coeficiente de distribución (D), que viene dado por la siguiente expresión matemática:

$$D = \frac{[A]_t}{[A]_{aq}}$$

donde $[A]_t$ y $[A]_{aq}$ son las concentraciones, en la fase rica de tensioactivo y en la fase acuosa, respectivamente.

Alternativamente, es posible relacionar la solubilización con la constante de equilibrio de la siguiente reacción:



En este caso, la transferencia del soluto al coacervado puede considerarse como una reacción en la que se origina un producto^(62,138) cuya constante de equilibrio viene dada por:

$$K_s = \frac{[\text{Solute}]_{\text{coacervado}}}{[\text{Tensioactivo}]_{\text{coacervado}} [\text{Solute}]_{\text{agua}}}$$

Los corchetes indican la concentración molar medida con respecto al volumen total de la disolución.

3.6.5. Modos de operación

Podemos distinguir dos modos de operación cuando se pretende extraer una muestra usando coacervados. El primero es válido tanto para extracciones líquido-líquido o sólido-líquido (Figura 15) y está basado en la formación del propio coacervado en presencia de la muestra:

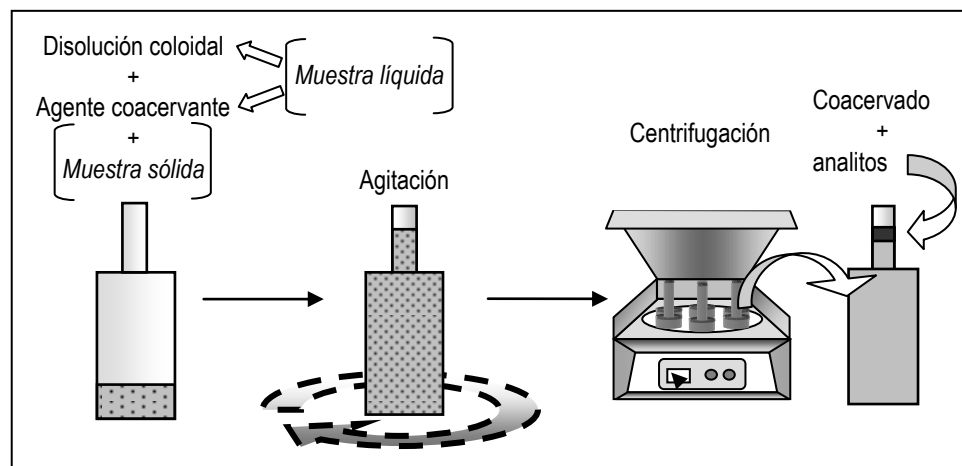


Figura 15. Modo de operación cuando la formación del coacervado se lleva a cabo en presencia de la muestra

Si la muestra es sólida, esta se introducirá en el sistema junto a la disolución coloidal y el agente coacervante. Si la muestra es líquida, generalmente acuosa, esta formará parte de la disolución coloidal, como disolvente o será el agente coacervante. En ambos casos, el siguiente paso es la agitación para asegurar la

[138] Hinze, W.L. and Armstrong D.W. (Eds.) *Ordered media in Chemical Separations*, ACS Symposium Series 342, American Chemical Society (1987) Washintong DC

puesta en contacto de la muestra y los analitos con el coacervado y su posterior centrifugación para separar las fases líquidas, y la sólida si es el caso. Los analitos extraídos suelen determinarse directamente mediante la inyección de una alícuota de coacervado en un cromatógrafo de líquidos.

En el segundo modo de operación (Figura 16) es necesario que el coacervado haya sido sintetizado previamente y separado de la disolución de equilibrio para ponerlo en contacto con la muestra. Una fase de agitación y otra de centrifugación (generalmente ultracentrifugación) aseguran una adecuada extracción y separación de fases previa a la inyección directa del coacervado en el sistema cromatográfico de líquidos.

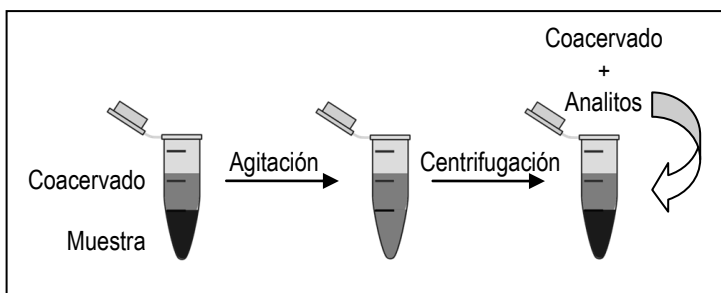


Figura 16. Modo de operación con adición directa del coacervado a la muestra

PARTE I

**ADSORBENTES PARA SPE:
HEMIMICELAS Y
SÓLIDOS MESOPOROSOS**

1. INTRODUCCIÓN

En este apartado se resumen las contribuciones más relevantes de las hemimicelas y materiales mesoporosos en el ámbito de la extracción en fase sólida y separaciones analíticas en general y se comenta la estructura, origen y legislación actual relacionada con los contaminantes determinados, ésteres de ftalato y compuestos de benzalconio.

1.1. Aplicaciones analíticas de hemimicelas

El fenómeno de la adsolubilización sobre hemimicelas/admicelas se ha utilizado entre otras aplicaciones para la descontaminación de suelos, tratamiento de aguas residuales, etc.⁽¹⁾ En Química Analítica, este fenómeno se ha utilizado para el desarrollo de la cromatografía admicelar,⁽²⁾ donde el principal problema hallado ha sido la progresiva elución del tensioactivo retenido en el soporte durante el desarrollo cromatográfico con la consiguiente irreproducibilidad en los tiempos de retención para los analitos cromatografiados. Asimismo, se ha aplicado a la extracción de metales pesados presentes en muestras acuosas mediante la formación de complejos con agentes quelatantes, previamente solubilizados sobre el agregado ⁽³⁻⁶⁾ o bien mediante formación de un quelato en disolución acuosa y posterior adsolubilización.

[1] Christian, S.D.; Scamehorn F.J. (Eds.). *Solubilization in Surfactant Aggregates*, Surfactant Science Series 55, Marcel Dekker (1995) New York

[2] Rubio, S. *New Challenges of Supramolecular Chemistry in Environmental Analysis*. 11as Jornadas de Análisis Instrumental (Noviembre 2005) Barcelona

[3] Hiraide, M.; Hori, J. *Anal. Sci.* 15 (1999) 1055

[4] Manzoori, J.L.; Sorouraddin M.H.; Shemirani, F. *Talanta* 42 (1995) 1151

Hasta hace relativamente poco tiempo, las hemimicelas/admicelas no se habían utilizado para la extracción/preconcentración de compuestos orgánicos previa a su determinación analítica. En los últimos años, sin embargo, se han desarrollado métodos para la extracción de una gran variedad de compuestos en muestras acuosas ambientales. La presencia de regiones de diferente polaridad en estos agregados supramoleculares muestra una excelente capacidad para solubilizar gran variedad de compuestos orgánicos.

Así, se han empleado hemimicelas del tensioactivo aniónico dodecil sulfato sódico (SDS) adsorbido sobre alúmina para la extracción/preconcentración de diferentes compuestos tales como clorofenoles,⁽⁷⁻⁸⁾ alquilfenoles y alquilfenoles carboxilados,⁽⁹⁾ hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs),⁽¹⁰⁾ estrógenos⁽¹¹⁾ presentes en muestras acuosas ambientales. En estos ejemplos el mecanismo de solubilización de los analitos sobre el agregado se debe al establecimiento de interacciones hidrófobas. También se ha propuesto, basado en este tipo de interacciones, la determinación de PAHs en muestras de agua de río y grifo usando tensioactivos catiónicos (bromuro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetil amonio y bromuro de octodeciltrimetil amonio) adsorbidos sobre sílice.⁽¹²⁾

Recientemente se han desarrollado métodos en los que el mecanismo de extracción se basa en la formación de agregados mixtos analito-extractante. Se han empleado hemimicelas de SDS adsorbidas sobre alúmina para extraer compuestos anfílicos por este mecanismo, como es el caso de la determinación de los homólogos del tensioactivo catiónico benzalconio⁽¹³⁾ o de los tensioactivos no iónicos alquilfenol etoxilados y alquil etoxilados.⁽¹⁴⁾ Se han empleado hemimicelas del tensioactivo catiónico cloruro de cetilpiridinio (CPC) adsorbidas sobre sílice para extraer los tensioactivos aniónicos alquilbenceno sulfonatos (LAS) a partir de muestras de agua residual y fluvial.⁽¹⁵⁾

[5] Hiraide, M.; Iwasawa, J.; Tawaguchi, H. *Talanta* 44 (1997) 231

[6] Manzoori, J.L.; Sorouraddin, M.H.; Shabani, A.H.M. *J. Anal. Atomic Spectrometry* 13 (1998) 305

[7] Saitoh, T.; Nakayama, Y.; Hiraide, M.T.; Bitting, D.; Harwell, J.H. *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 205

[8] Saitoh, T.; Matsushima, S.; Hiraide, M. *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 185

[9] Cantero, M.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 271

[10] Saitoh, T.; Matsushima, S.; Hiraide, M. *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 271

[11] Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Analyst* 131 (2006) 835

[12] Zhao, Q.; Simmons, J.; Conte, E.D. *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 1

[13] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799

[14] García-Prieto, A.; Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Analyst* 131 (2006) 407

[15] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1100 (2005) 8

Dado que el tipo de interacción puede variar dependiendo de la naturaleza del grupo polar del tensioactivo, se puede seleccionar a priori el adsorbente más adecuado para una aplicación concreta. Así, se ha llevado a cabo la extracción de benzimidazoles⁽¹⁶⁾ y herbicidas de amonio cuaternario “quats”⁽¹⁷⁾ utilizando admicelas de SDS sobre alúmina donde los analitos se retienen mediante interacciones de tipo electrostático o por formación de pares iónicos, respectivamente. En la aplicación relativa a los quats, se propuso por vez primera el acoplamiento on-line de un adsorbente de SPE basado en agregados supramoleculares de tensioactivo a cromatografía de líquidos.⁽¹⁸⁾

Las hemimicelas/admicelas mixtas de tetrabutilamonio (TBA)-SDS adsorbidas sobre alúmina ofrecen otro mecanismo de retención de analitos por el establecimiento de interacciones π -catión entre el grupo aromático de estos y el grupo amonio del tetrabutilamonio. Con esta estrategia se han extraído bisfenoles⁽¹⁹⁾ y se ha desarrollado un análisis multirresidual de plaguicidas.⁽²⁰⁾

El uso de partículas magnéticas recubiertas de distintos materiales está adquiriendo importancia creciente no solo en distintas aplicaciones tecnológicas, sino también en procesos de extracción analítica. Así la quimioadsorción de alquilcarboxilatos sobre partículas magnéticas para formar hemimicelas y ferrofluidos magnéticos es ampliamente utilizada en la construcción de altavoces, componentes informáticos y para diversas aplicaciones de ingeniería y mecánica,⁽²¹⁻²²⁾ Asimismo se utilizan partículas cubiertas con diversos materiales como sílice o carbón vegetal⁽²³⁾ y más recientemente polímeros.⁽²⁴⁾ Las partículas magnéticas funcionalizadas se han aplicado a la extracción de sustancias orgánicas y metales.⁽²⁵⁻²⁶⁾ Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una aplicación en la que se extrajeron hidrocarburos aromáticos policíclicos empleando partículas de magnetita sobre la que se quimisorbieron alquilcarboxilatos formando hemimicelas.⁽²⁷⁾

[16] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 132

[17] Atwood, J.L.; Steed, J.W. (Eds.) *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker (2004) New York

[18] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878

[19] Bohmer, M.R.; Koopal, L.K.; *Langmuir* 8 (1992) 2649

[20] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61

[21] Shen, L.; Stachowiak, A. *Langmuir* 15 (1999) 447.

[22] Li, Q.; Xuan, Y. M.; Wang, J. *Exp. Therm. Fluid. Sci.* 30 (2005) 109.

[23] Šaňáková, M.; Šaňák, I. *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) 108.

[24] Šaňáková, M.; Lunackova, P.; Komarek, K.; Hubka, T.; Šaňák, I. *J. Magn. Magn. Mater* 311 (2007) 405

[25] Sha, Y.; Deng, C.; Liu, B. *J. Chromatogr A* 1199 (2008) 27.

[26] Huang, C.; Hun, B. *Spectrochim. Acta, Part B* 63 (2008) 437.

[27] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S. *Anal. Chem.* 81 (2009) 9012.

1.2. Ésteres de ftalato: Usos y toxicidad

Los ésteres del ácido ftalático (PAEs o ftalatos) son un grupo de compuestos derivados del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (o ácido ftalático) esterificado con alcoholes (Figura 1), que han sido muy empleados en la industria desde hace ya varias décadas. Suponen el 90% del total de los plastificantes (aditivos de los plásticos) producidos en Europa Occidental, donde se fabrican más de un millón de toneladas anuales. Los ftalatos confieren a los plásticos

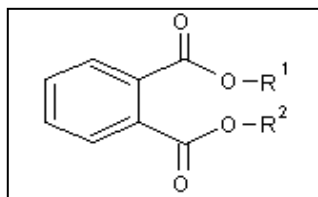


Figura 1: Estructura de los PAEs

ciertas características como elasticidad o resiliencia, además de conseguir que sean más resistentes y duraderos. Su presencia se constata en un buen número de productos de uso muy extendido (no todos basados en el PVC) tales como alfombras y cortinas sintéticas, revestimientos para paredes, suelos o muebles, productos cosméticos (perfumes, laca para uñas...), pegamentos, un buen número de elementos de PVC que son empleados en la construcción de viviendas, automóviles, redes de cableado y, por último, en material (bolsas y tubos) para infusión, recogida y conservación de líquidos biológicos o medicamentosos en el ámbito sanitario.

Los PAEs más empleados por la industria han sido el bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP), el diisononil ftalato (DiNP), el diisodecil ftalato (DiDP), el butil bencil ftalato (BBP) y el dibutilftalato⁽²⁸⁾ (DBP) aunque son el DEHP, el DBP y el BBP los que han suscitado un mayor interés desde el punto de vista de su control y, por tanto, para los que la legislación ha sido más intensa. Es por esto que se seleccionaron como analitos de interés para el estudio de extracción con hemimicelas (Tabla 1).

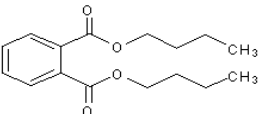
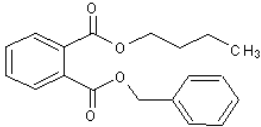
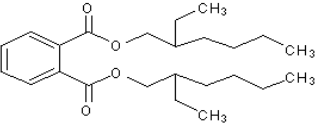
Numerosos estudios, desde hace unas cinco décadas, han demostrado la toxicidad de los ftalatos para los animales y las personas. El DEHP es tóxico para el desarrollo del sistema reproductor masculino⁽²⁹⁾ debido a un metabolito, el mono(etilhexil) ftalato (MEHP). Sobre el MEHP se han publicado estudios donde se le relaciona con afectaciones al desarrollo y a la función hepática, incluyendo el

[28] ECOBILAN (PricewaterhouseCoopers). Eco-profile of high volume commodity phthalate esters (DEHP/DINP/DIDP). The European Council for Plasticisers and Intermediates. 2001. <http://www.ecpi.org/upload/documents/document31.pdf>

[29] Park, J.D.; Habeebu, S.S.M.; Kaassen, C.D. *Toxicology* 171 (2002) 105

metabolismo hormonal y la función inmune.^(30,31) Otros estudios incluyen al DBP y al BBP entre las sustancias que son tóxicas para la reproducción.^(32,33)

Tabla 1: PAEs seleccionados para el estudio de extracción con hemimicelas

Nombre	Siglas		CAS	Kow
Dibutil ftalato	DBP		84-74-2	4.45
Butil bencil ftalato	BBP		85-68-7	4.59
Bis (2-etilhexil) ftalato	DEHP		117-81-7	7.50

La legislación norteamericana establece dos niveles para DEHP en aguas potables: un máximo admisible (MCL) de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ y un nivel objetivo (MCLG) fijado en 0. En Europa, los ftalatos han despertado una profunda preocupación y forman parte de diferentes listas de sustancias cuyo uso está legislado o para las cuales existen recomendaciones. Así, en 1999 la Unión Europea, a través de la decisión 1999/815/CE prohíbe la utilización de ftalatos en artículos de puericultura, poniendo especial énfasis en aquellos que son destinados a ser introducidos en la boca por niños menores de tres años. Asimismo, la decisión 2002/231/CE prohíbe la concesión de la etiqueta comunitaria de “calzado ecológico” a aquel para cuya utilización se haya usado PVC o PVC reciclado con los ftalatos DEHP, DBP o BBP en su composición.

Más recientemente y de acuerdo con la aprobación de la directiva marco de aguas, la Unión Europea, a través de las recomendaciones 2008/98/CE y 2008/447/CE, aconseja que las emisiones locales de DEHP y BBP a ríos se controlen cuando puedan constituir un riesgo ambiental.

[30] Dalgaard, M.; Nellesmann, C.; Lam, H.R.; Sorensen, I.K.; Ladefoged, O. *Toxicol.Lett.* 122 (2001) 69

[31] Wong, J.S.; Gill, S.S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185 (2002) 180

[32] Ema, M.; Miyawaki, E. *Reproductive Toxicology* 16 (2002) 71

[33] Mylchreest, E.; Sar, M.; Wallace, D.G.; Foster, P.M.D. *Reprod. Toxicol.* 16 (2002) 19

La Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (European Chemical Agency, ECHA) es el organismo encargado de llevar a cabo las actuaciones previstas en el REACH. De este modo, la ECHA publica una lista de sustancias candidatas a restricción donde se engloban aquellas sustancias que son consideradas “altamente preocupantes” (substances of very high concern, SVHC) entre las que se incluyen los tres PAEs que han sido seleccionados para este estudio. En los documentos informativos de cada uno de los compuestos⁽³⁴⁻³⁵⁾ estos son clasificados como sustancias tóxicas para la reproducción de categoría 2: que pueden causar daño a fetos.

1.3. Aplicaciones analíticas de los sólidos mesoporosos

Hasta la fecha, los sólidos síliceos mesoporosos se han aplicado en catálisis,⁽³⁷⁾ sensores ópticos,⁽³⁸⁾ administración de fármacos,⁽³⁹⁾ transfección de genes,⁽⁴⁰⁾ inmovilización de células vivas, biomoléculas y enzimas⁽⁴¹⁾ y descontaminación de aguas.⁽⁴²⁻⁴⁵⁾

Sus excelentes características adsorbentes⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ los hacen muy atractivos para llevar a cabo separaciones analíticas, si bien hasta el momento, los sólidos mesoporosos han sido muy poco empleados en esta área, y las aplicaciones desarrolladas han estado muy enfocadas hacia su uso como fase estacionaria en cromatografía de líquidos⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ para macromoléculas tales como las proteínas. Más

[34] European Chemicals Agency. Member state committee support document for identification of dibutylphthalate (DBP) as a substance of very high concern. Helsinki. 2008.

http://echa.europa.eu/doc/candidate_list/svhc_supdoc_dibutylphthalate_publication.pdf

[35] European Chemicals Agency. Member state committee support document for identification of benzyl butyl phthalate (BBP) as a substance of very high concern. Helsinki. 2008.

http://echa.europa.eu/doc/candidate_list/svhc_supdoc_bbp_publication.pdf

[36] European Chemicals Agency. Member state committee support document for identification of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) as a substance of very high concern. Helsinki. 2008.

http://echa.europa.eu/doc/candidate_list/svhc_supdoc_dehp_publication.pdf

[37] D. Trong On, D. Desplandier-Giscard, C. Danumah, S. Kaliaguine, Applied Catalysis A 222 (2001) 299.

[38] G. Wirmsberger, P. Yang, B.J. Scott, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Spectrochimica Acta Part A 57 (2001) 2049.

[39] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regi, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 8116.

[40] D. Radu, Ch. Y. Lai, K. Jeftinija, E.W. Rowe, S. Jeftinija, V. Lin, J. Am. Soc. 126 (2004) 13216.

[41] J. Fan, J. Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao, Chem. Commun. 17 (2003) 2140.

[42] X. Feng, G.E. Fryxell, L.Q. Wang, A.Y. Kim, J. Liu, K.M. Demner, Science 276 (1997) 923.

[43] J. Liu, X. Feng, G.E. Fryxell, L.Q. Wang, A.Y. Kim, M. Gong, Chem. Eng. Technol. 21 (1998) 97.

[44] L. Mercier, T.J. Pinnavaia, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2749.

[45] L. Mercier, T.J. Pinnavaia, Adv. Mater. 9 (1997) 500.

[46] B. Coasne, A. Galameau, F. Di Renzo, R.J.M. Pellenq, Langmuir 22 (2006) 11097.

[47] Y.X. Zhao, M.Y. Ding, D.P. Chen, Anal. Chim. Acta 542 (2005) 193.

[48] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 470.

[49] M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüt, K.K. Unger, J. Chromatogr. A 740 (1996) 1.

recientemente, estos materiales se han propuesto para llevar a cabo el enriquecimiento en línea de compuestos orgánicos volátiles atmosféricos.⁽⁵²⁾

1.4. Compuestos de benzalconio: Usos y toxicidad

Los compuestos de benzalconio (BAS) se utilizan por sus propiedades biocidas para controlar la proliferación de microorganismos en una variedad de productos. Los más usados son los alquil-dimetil-benzalconios, con cadenas hidrocarbonadas de 12, 14 y 16 unidades (Figura 2), aunque frecuentemente se encuentran en forma de mezclas heterogéneas constituidas por varios homólogos. Su uso extendido en productos de consumo personal origina residuos domésticos que alcanzan los cauces fluviales a través de los efluentes de los sistemas de depuración donde los tratamientos comúnmente aplicados no consiguen la eliminación de los BAS

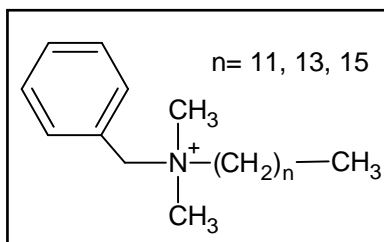


Figura 2: Estructura general de los BAS estudiados

Es el efecto biocida antes descrito el que causa sus efectos más nocivos para el medioambiente, ya que provoca daños en sistemas ecológicos naturales a donde llegan procedentes de los efluentes domésticos. La UE restringe su presencia en diferentes productos cosméticos para el cabello⁽⁵³⁾, limitando su concentración al 0,1% (aunque se permite en una concentración de hasta el 3% cuando su empleo tiene un objetivo distinto al de conservación de productos)

[50] K. Nakanishi, R. Takahashi, T. Nagakane, K. Kitayama, N. Koheiya, H. Shikata, N. Soga, J. Sol.-Gel. Sci. Technol. 17 (2000) 191.

[51] K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, J. Sol.-Gel. Sci. Technol. 13 (1998) 163.

[52] T.M. Wu, G.R. Wu, H.M. Kao, J.L. Wang, J. Chromatogr. A. 1105 (2006) 168.

[53] Reglamento (CE) N° 1123/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre productos cosméticos.

Sin embargo, a pesar de que se han descrito efectos ecotoxicológicos de los BAS relacionados con sus propiedades tanto en organismos acuáticos⁽⁵⁴⁾ como en mamíferos⁽⁵⁵⁾, su presencia en aguas naturales no ha sido legislada, aunque sí se considera que es importante su control analítico en ambientes acuáticos para estudiar su distribución y efectos.

[54] J. Sánchez-Leal, J.J. González, K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, F. Comelles, M.T. García, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 22 (1994) 13.

[55] F. Ferk, M. Misik, C. Hoelzl, M. Uhl, M. Ferhacker, B. Grillistich, W. Parzefall, A. Nersesyan, K. Micieta, T. Grummt, v. Ehrlich, s. Knasmueller, *Mutagenesis* 22 (2007) 363.

PARTE I

CAPÍTULO 1

**DETERMINATION OF PHTHALATE
ESTERS IN SEWAGE BY
HEMIMICELLES-BASED
SOLID-PHASE EXTRACTION AND
LIQUID CHROMATOGRAPHY-
MASS SPECTROMETRY**

Determination of phthalate esters in sewage by hemimicelles-based solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry

Analytica Chimica Acta 551 (2005) 142–149

Francisco José López Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez Bendito

Abstract

Hemimicelles-based solid-phase extraction was proposed for the concentration of high volume commodity phthalates from wastewater samples prior to their separation and quantitation by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization in positive mode, ion trap mass spectrometry. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), butyl benzyl phthalate (BBP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) were concentrated on hemimicelles of sodium dodecyl sulphate (SDS) produced on alumina on the basis of hydrophobic interactions. The recovery of the target compounds was found quantitative under a wide range of experimental conditions (15–255 mg SDS g⁻¹ alumina, pH 2–6 and sample loading volume up to 1 L). Concentration factors of 2500 were achieved by SPE of 0.5 L of sewage samples. The method detection limits found for BBP, DBP and DEHP were 7, 15 and 16 pg, respectively. The relative standard deviation ranged from 2 to 5%, which indicated good method precision. The approach developed was applied to the determination of phthalates in raw and treated sewage samples.

1. Introduction

Phthalic acid esters (named PAEs or simply phthalates) are used in the industry as plastic additives due to their excellent properties and compatibility with vinyls and other polymers. They represent more than 90% of the Western European plasticizers market. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) accounts for about 50% of the total production of PAEs. Other high volume commodity phthalates are butyl benzyl phthalate (BBP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP).⁽¹⁾ We can find PAEs in the composition of soft PVC, carpet backings, coatings, paints, glues, cosmetics, plastic medical devices and other quotidian elements.

The presence of phthalates in many daily-used objects, their reported estrogenic character⁽²⁾ and their high environmental diffusion have been the reasons why regulations on water and air concentrations, disposal and worker exposure criteria have been formulated for the most heavily used phthalates. Thus, the US Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum admissible concentration (MAC) in water of 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DEHP. The levels reported for DBP, BBP and DEHP are in the range 0.02–0.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for drinking water,⁽³⁾ 0.1–100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for surface water, 0.2–110 $\mu\text{g L}^{-1}$ for treated wastewater⁽⁴⁾ and 0.1–12 $\mu\text{g L}^{-1}$ for treated industrial wastewater.⁽⁵⁾

The most common technique for PAEs determination in environmental samples has been gas chromatography with detection through electron capture⁽⁶⁻⁷⁾ or mass spectrometry.^(3,5,8-9) As a rule, extensive sample treatment, involving repetitive liquid–liquid extractions and cleanup steps with large amounts of reagents and solvents, is required, which introduces considerable levels of PAEs into the sample matrix.⁽¹⁰⁻¹¹⁾ In recent years, solid-phase microextraction (SPME) has been

[1] ECOBILAN (PricewaterhouseCoopers), Eco-profile of high volume commodity phthalate esters (DEHP/DINP/DIDP), The European Council for Plasticisers and Intermediates, 2001, www.ecpi.org/upload/documents/document31.pdf

[2] C.A Harris, P. Henttu, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *Environ. Health Perspect.* 105 (1997) 802

[3] K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 93

[4] H. Fromme, T. Kuchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller, A. Wenzel, *Water Res.* 36 (2002) 1429

[5] A. Peñalver, E. Pocerull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 872 (2000) 191

[6] J.A. Glazer, G.D. Foerst, G.D. McKee, S.A. Quave, W.L. Budde, *Environ. Sci. Technol.* 15 (1981) 1426

[7] G. Prokúpková, K. Holadová, J. Pouška, J. Hajšlová, *Anal.Chim. Acta* 457 (2002) 211

[8] J. Vikelsøe, M. Thomsen, L. Carlsen, *Sci. Total Environ.* 296 (2002) 105

[9] E. Cortazar, O. Zuloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 165

[10] V. López-Ávila, J. Milanés, F.J. Constantine, *Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (1990) 709

[11] R.J. Law, T.W. Fileman, P. Matthiessen, *Water Sci. Technol.* 24 (1991) 127

extensively investigated to simplify sample treatment prior to GC analysis of PAES.^(3,5,7,9,12-14) The use of SPME reduces the risk of secondary contamination during sample handling, however, some drawbacks such as low extraction yields, long extraction times and/or poor precision still remain.

Reversed-phase liquid chromatography with UV or mass detection spectrometry, combined with solid-phase extraction, has been also extensively used for PAEs analysis.⁽¹⁵⁻²³⁾ Materials used as sorbents include silica-based C18⁽¹⁵⁾ and C8,⁽¹⁶⁾ organic polymers,⁽¹⁸⁻²¹⁾ carbon nanotubes⁽²²⁾ and microorganisms immobilized on silica gel.⁽²³⁾ Recoveries obtained for phthalates were strongly dependent on the material used; silica-based C8,⁽¹⁶⁾ poly(styrene-divinylbenzene),⁽¹⁸⁾ carbon nanotubes⁽²²⁾ and the microorganisms *Saccharomyces cerevisiae*⁽²³⁾ have produced the best results so far. A priority goal in this context is to reduce sample treatment to the minimal steps in order to avoid PAEs contamination.

Hemimicelles and admicelles have been recently used as sorbent materials for the SPE of organic compounds.⁽²⁴⁻²⁶⁾ These sorbents are formed by interaction of ionic surfactants with mineral oxides oppositely charged.⁽²⁷⁻²⁸⁾ Hemimicelles are described as monolayers of surfactants adsorbed on the oxide surface by electrostatic interactions. Admicelles have been traditionally described as surfactant bilayers produced from hemimicelles under addition of more surfactant. Information gained in the last few years on the admicellar region using techniques such as atomic force microscopy, fluorescence quenching and neutron reflectivity have evidenced the presence of discrete surface aggregates, similar to aqueous

-
- [12] M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 225
 - [13] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 177
 - [14] A. Peñalver, E. Pocurrull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 377
 - [15] K. Holadová, J. Hajšlová, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59 (1995) 43
 - [16] M.L. Davi, M. Liboni, M.G. Malfatti, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 74 (1999) 155
 - [17] S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 582
 - [18] S. Jara, C. Lysebo, T. Greinbrokk, E. Lundanes, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 165
 - [19] S. Jonsson, H. Borén, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 393
 - [20] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180
 - [21] T. Suzuki, K. Yaguchi, S. Suzuki, T. Suga, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3757
 - [22] Y.Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 149
 - [23] H. Katsumata, A. Begum, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 67
 - [24] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878
 - [25] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799
 - [26] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 161
 - [27] J.H. O'Haver, J.H. Harwell, L.L. Lobban, E.A. O'Rear, in: S.D. Christian, J.F. Scamehorn (Eds.), *Solubilization in Surfactant Aggregates*, Dekker, New York, 1995, Chapter 8
 - [28] K.T. Valsaraj, *Sep. Sci. Technol.* 27 (1992) 1633
-

micelles, in many surfactant-oxide systems,⁽²⁹⁾ which suggests that the surfactant adsorption mechanism on mineral oxides is far from being completely elucidated.

A main characteristic of hemimicelles and admicelles is their versatility. Thus, the outer surface of hemimicelles is hydrophobic whereas that of admicelles is ionic, which provides different mechanisms for retention of organics. On the other hand, the number of surfactants commercially available is very high, so both the degree of hydrophobicity and the charge of the sorbent can be easily modified according to the nature of analytes. High yields and breakthrough volumes have been obtained for the extraction of organic compounds of different nature, such as ionics,⁽²⁴⁾ and amphiphilics,⁽²⁵⁻²⁶⁾ from environmental samples, with no clean-up steps required. These characteristics make hemimicelles and admicelles to have a high potential for the SPE of pollutants.

This paper deals with the use of sodium dodecyl sulfate (SDS)-alumina hemimicelles for the concentration of the high volume commodity phthalates BBP, DBP and DEHP in environmental water samples. Reversed-phase liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/ion trap mass spectrometry (LC-(APCI⁺-IT)MS) was used for their identification and quantitation. Predominant factors influencing the retention of PAEs were investigated. The feasibility of the method was proven by analysis of the target compounds in sewage samples from various wastewater treatment plants (WWTPs).

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

All reagents used were of analytical reagent-grade and were used as supplied. The surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) was obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). PAEs [di-*n*-butyl phthalate (DBP), butyl benzyl phthalate (BBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)] were obtained from Riedel de Haën (Seelze, Germany). Stock solutions of PAEs (2.5 g L⁻¹) were prepared in methanol, preserved of light and stored at 4°C. Nitric acid, technical grade acetone and HPLC-grade acetonitrile and methanol were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Alumina (γ -form, for column chromatography) was supplied by Sigma (St. Louis,

[29]R. Atkin, V.S.J. Craig, E.J. Wanless, S. Biggs, *Adv. Colloid Interface Sci.* 103 (2003) 219

MO, USA). The physical properties of this mineral oxide were as follows: surface area, 155 m² g⁻¹; point of zero charge (pcz), 8.5; particle diameter range, 50–200 μm (mean value 100 μm); mean pore size, 58 Å; density, 3.97 g cm⁻³. Cartridge columns filled with 500 mg alumina were obtained from Varian (Victoria, Australia). Glassware was scrupulously cleaned according to the recommendations specified in EPA method 506. Briefly, after washing with hot water and detergent and rinsing with tap and reagent water, thorough rinsing with technical-grade acetone was performed. Then, glassware was sealed with aluminum foil and stored in a clean environment.

2.2. Sample collection and preservation

Influent and effluent water samples were collected from different WWTPs (Linares, Puente Genil, Lucena, Bailén and Arahál) in the south of Spain in December 2004. Most of these WWTPs receive a mixture of domestic and industrial wastewater. Although the contribution of the industrial activity to the total influent of a WWTP can be highly variable with time, the following inputs of industrial effluents were estimated for the WWTPs studied from the data supplied by the personnel working in: ≈30–50% for Linares (mainly from the car and engineering industries); ≈70–80% for Puente Genil (from the food industry); ≈40–50% for Lucena (from the furniture and bronze factories); ≈20–40% for Bailén (mainly from brickworks, ceramic and olive oil industries). Samples were collected into well-cleaned, light-preserved glass recipients. For cleaning, bottles and cap liners were washed and rinsed with acetone in the same way that laboratory glassware. Samples were immediately filtered through 0.45 μm filters (Whatman GF/F, Osmonics, France) in order to remove suspended solids. We realized that these filters contained a considerable amount of DBP, so their cleaning with acetone was carried out prior filtration. The filtered samples were adjusted to pH 2 by the addition of concentrated nitric acid and stored at 4°C until analysis.

2.3. Hemimicelles extraction

The cartridge columns were conditioned with 10 mL of a nitric acid solution (pH 2). Then, hemimicelles were formed on the alumina by passing a 25 mL 0.01 M nitric acid solution containing 40 mg of SDS. Samples (500 mL) were preconcentrated on the hemimicelles and PAEs were eluted with 2 mL of methanol.

Sample loading was performed by using a vacuum pump (Eyela A35, Rikakikai Co., Tokyo) at a flow rate of 20 mL min⁻¹. The eluate was dried with a stream of nitrogen and then reconstituted in 200 µL of methanol. The solution was stirred in an ultrasonic bath for 10 min, in order to guarantee the total dissolution of PAEs, and filtered through a 0.45 µm nylon syringe-filter (Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain). This filter was previously cleaned with acetone to prevent contamination of samples. One hundred microliters of the eluate was injected into the LC system under the conditions specified below.

2.4. Liquid chromatography/mass spectrometry

PAEs identification and quantification was carried out using a liquid chromatography/ion trap–mass spectrometry system (1100 series LC/MSD, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with an automatic injector. The analytical column was a 15 cm Hypersil C18 (5 µm particle diameter and 4.6 mm i.d.) supplied by Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain). Methanol and water were the elution solvents and the gradient program consisted of linear gradient from 40 to 90% of methanol in 25 min and then, isocratic conditions with 100% methanol for 10 min. The injection volume was 100 µL and the mobile phase flow rate was 1 mL min⁻¹. The diver valve was programmed to send the mobile phase containing SDS and the most polar matrix compounds to waste. So, only 20 min after the beginning of the elution gradient program, the eluted components were sent to the ionization source.

Mass analysis was performed with an APCI source in the positive ion mode. The set of parameters used is shown in Table 1. They were optimized by directly analyzing each PAE (2 mg L⁻¹) in a methanol:water mixture with composition similar to that in which the phthalates eluted from the chromatograph. For these experiments, a KD Scientific, model 100, syringe pump (New Hope, MN, USA), at 700 µL h⁻¹, was used. Full scan data acquisition was performed from 270 to 400 m/z with the target mass fixed to the following m/z values: 313 for BBP, 279 for DBP and 391 for DEHP, which corresponded to $[M + 1]$ ions. PAEs were quantified in all cases from the corresponding peak areas of the extracted ion chromatograms. Smooth chromatograms were obtained by using the Gauss function (width = 3 points, cycles = 1). External calibration was carried out. Correlation between peak areas and PAE concentrations (50–5000 ng absolute amount) were determined by linear regression

and were in the range 0.9995 and 0.99993. The analysis of a sewage sample involved the following sequence; two procedural blanks, triplicate sewage samples and one PAE native-spiked sample. PAEs standard mixtures (two to three) were measured at the beginning and at the end of the sequence.

Table 1. APCI(+)/(IT)MS parameters set for the determination of PAEs

	Parameter	Value
Source	Capillary voltage (V)	-3500
	End plate voltage (V)	-500
	Corona discharge current (nA)	4000
	Nebulizer pressure (N ₂) (psi)	60
	Dry gas (He) (L min ⁻¹)	7.5
	APCI temperature (°C)	325
	Dry temperature (°C)	300
	Ion transport region	Skimmer voltage
Capillary exit voltage		102
Octopole 1 dc voltage (V)		7.5
Octopole 2 dc voltage (V)		2.77
Trap drive		45.87
Octopole radiofrequency		50 V peak-to-peak
Lens 1 voltage (V)		-23.85
Lens 2 voltage (V)		-100
Ion trap	Ion charge control target	20000
	Maximal accumulation time (ms)	100
	Scan (<i>m/z</i>)	270–400

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation/ mass detection

A variety of mobile phases, including mixtures of acetonitrile:water,⁽²¹⁻²²⁾ methanol:water⁽³⁰⁾ and ethanol:water,⁽²³⁾ have been proposed for the separation of PAEs. At the onset of our work, preliminary experiments indicated that acetonitrile:water provided the best resolution for BBP, DBP and DEHP mixtures.

[30] Z.P. Lin, M.G. Ikonou, H. Jing, C. Mackintosh, F.A.P.C. Gobas, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2100

Unfortunately, acetonitrile is not a good APCI solvent because it has shown to quickly carbonize the corona needle, which can lead to reduced total ion current. To minimize this problem, the diver valve was programmed to send the mobile phase to waste except for segments of time corresponding to chromatogram zones where the target compounds eluted. However, reduction of the ion current was observed after six to seven consecutive sample injections. So, we selected methanol and water as the elution solvents. To preserve the APCI source from contamination from the more polar matrix components and SDS the diver valve was programmed to send them to waste. The separation of the three phthalates was optimized and the optimal conditions are specified in Section 2. Figure 1a shows a typical chromatogram from a PAEs standard solution.

3.2. SDS aggregates-based SPE

Sodium dodecyl sulfate adsorbs on alumina according to a typical four region isotherm,⁽²⁴⁾ each featuring different conformations for the adsorbed surfactant, and three adsorption mechanisms,⁽²⁹⁾ namely, electrostatic, electrostatic-hydrophobic and hydrophobic (Figure 2). In the first region (the Henry's law region), surfactant molecules are electrostatically adsorbed to the charged surface sites. Adsorption is sparse, so interactions between adsorbed surfactant molecules are negligible. The region II involves strong lateral interaction between adsorbed monomers, resulting in the formation of primary aggregates, known as hemimicelles.

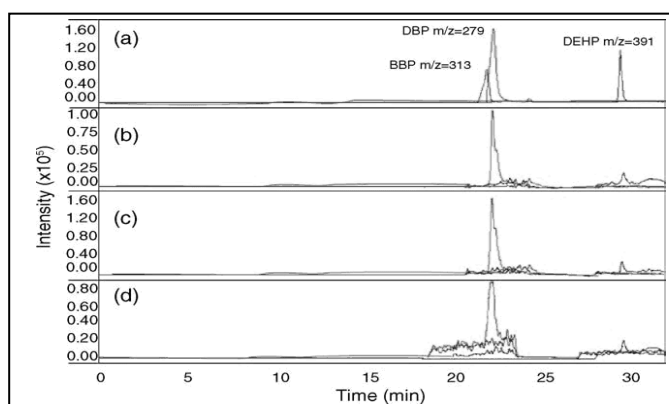


Figure 1: LC/MS extracted ion chromatograms obtained from (a) a standard solution and (b–d) wastewater influent samples collected in the following WWTPs: (b) Puentegeñil, (c) Lucena and (d) Arahal

The adsorption is thus driven both by hydrophobic interactions and electrostatic attraction. At the end of this isotherm span, the overall surface charge is neutralized and further adsorption is purely hydrophobically driven. Although an incomplete and fully formed bilayer have been assumed to form in the third and fourth regions, respectively, strong evidence for the presence of discrete aggregates in these regions is now available.⁽²⁹⁾ The three types of SDS aggregates suitable for SPE methods (hemimicelles, mixed hemimicelles–admicelles and admicelles below the cmc), are in equilibrium with aqueous SDS monomers. Above the cmc, aqueous SDS micelles are in equilibrium with admicelles, which causes partition of analytes between both types of surfactant aggregates and prevent this isotherm span to be used for SPE.

In order to use SDS-coated alumina for SPE of phthalates, we must consider that these compounds are neutral and non-polar, so their retention on hemimicelles and admicelles should be primarily governed by hydrophobic interactions. Below, the main factors affecting the SPE sequence are discussed.

3.2.1. Sorbent selection

The adsolubilization of PAEs on SDS-coated alumina as a function of SDS concentration was investigated in order to determine which kind of surfactant aggregate was the best sorbent for their retention. Experiments were carried out in the batch mode. For studies involving DBP and BBP, 25 mL of an aqueous solution containing SDS at pH 2 (adjusted with nitric acid) were added to 500 mg of alumina. The total amount of anionic surfactant added ranged from 7.5 to 127 mg. In this way, different surfactants aggregates were sequentially obtained; hemimicelles from 7.5 to 40 mg SDS, mixed hemimicelles–admicelles between 40 and 100 mg SDS, and admicelles from 100 to 127 mg SDS. For SDS amounts above 127 mg, the monomeric surfactant concentration in the aqueous solution after adsorption exceeded the critical micellar concentration (cmc), and aqueous micelles and admicelles were in equilibrium. One hundred microliters of a 2.5 g L⁻¹ DBP or BBP methanol stock solution were added to each SDS-alumina aqueous suspension. Then, the mixture was stirred for 5 min and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The concentrations of DBP and BBP in supernatants were determined by LC/MS, as specified under Section 2. For adsolubilization studies involving DEHP, owing

to its low solubility in water (around $3 \mu\text{g L}^{-1(31)}$), this phthalate (100 μL of a 2.5 g L^{-1} methanol stock solution) was dissolved in a SDS micellar solution (pH 2) before mixing it with alumina. Since the cmc of SDS at pH 2, calculated from surface tension measurements is 1417 mg L^{-1} , the amount of SDS studied ranged between 37 and 127 mg and only a small span of the hemimicellar region could be investigated.

Figure 3 depicts the percentages of adsolubilized BBP and DEHP as a function of the amount of SDS adsorbed on the alumina surface. Results for DBP were similar to those obtained for BBP (data not shown). PAEs did not adsorb at all in the absence of SDS, however, as a consequence of their hydrophobicity, only a minimal amount of hemimicelles was required for quantitative adsorption of the target compounds. The amount of PAEs retained was also quantitative on sorbents made of mixed hemimicelles/admicelles and single admicelles. PAEs retention in the admicellar region progressively decreased from SDS concentrations at which micelles were formed in the bulk aqueous solution due to partition of analytes between micelles and admicelles. So, these results indicated that the three types of SDS-alumina sorbents were effective to retain PAEs.

Additional experiments were carried out to comparatively study the adsorption capacity for PAEs of hemimicelles, mixed hemimicelles/admicelles and admicelles. For this purpose, the concentration of PAEs ranged to give SDS/PAEs molar ratios between 1 and 10 for each of the SDS sorbents. Experiments were carried out in the batch mode in a similar way to that described above. PAEs adsolubilization values higher than 99% were always achieved.

Therefore, since the different SDS-alumina sorbents showed similar adsorption capacity for PAEs, hemimicelles were the sorbent selected on the basis of experimental convenience. In the hemimicellar region, the concentration of SDS monomers in the aqueous phase is negligible (around $5 \mu\text{g L}^{-1}$), which permits to use these aggregates in SPE without supply of the surfactant during operation. On the contrary, in the admicellar region, it is recommended a supply of SDS (amount easily inferred from the adsorption isotherm) that keeps constant the initial conditions selected in order to guarantee a unique partition constant for analytes. A SDS amount of 80 mg g^{-1} alumina was recommended for extraction of PAEs.

[31]C.A. Staples, D.R. Peterson, T.F. Parkerton, W.J. Adams, *Chemosphere* 35 (1997) 667

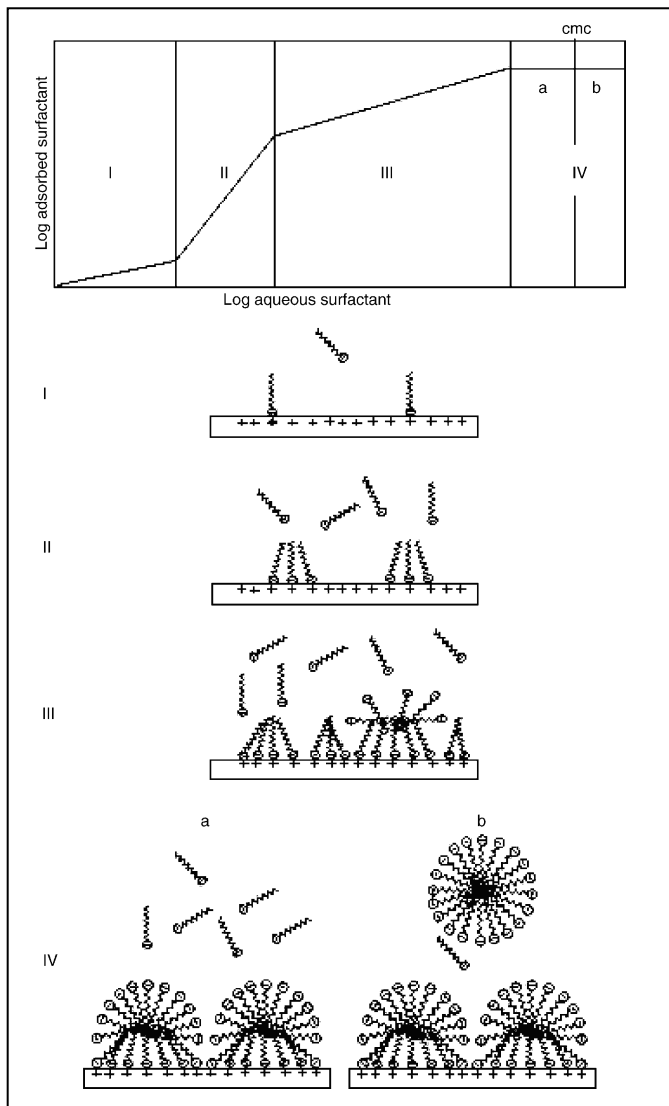


Figure 2. Typical adsorption isotherm for surfactants on mineral oxide surfaces and proposed surfactant aggregates in each isotherm span

3.2.2. Optimization

The pH modifies the charge density on the alumina surface (point charge zero: 8.5) and therefore the amount of surfactant adsorbed in the isotherm regions. This amount decreases with increasing pH values. Thus, the maximal amount of SDS adsorbed in the hemimicellar region was about 80 and 20 mg g⁻¹ alumina at pH 2 and 6, respectively. Nevertheless, PAEs adsolubilization in this pH range kept constant due to the excess of sorbent with respect to the target compounds. Acid pH values (e.g. 2–3) are recommended for experimental work since breakthrough of analytes should be delayed with decreasing pH because of the higher amount of sorbent available.

Desorption of PAEs from SDS hemimicelles was studied using organic solvents (acetonitrile and methanol), which are known to disrupt the surfactant aggregates. Quantitative recovery of PAEs was observed from 2 mL of methanol, so this organic solvent was recommended for their elution. Phthalate recoveries using 1 mL of methanol were 83, 76 and 66% for DBP, BBP and DEHP, respectively. Acetonitrile was less efficient than methanol for PAEs elution. Thus, recoveries for PAEs were only quantitative for acetonitrile volumes above 3 mL.

The breakthrough volume was determined by SPE of increasing volumes (0.025–1 L) of aqueous solutions at pH 2 containing the same amount of PAEs, and then, measuring the peak areas eluted from the sorbent. The loading of the target analytes was 1 µg. Breakthrough was considered to occur when the amount eluted decreased about 5%. Recoveries of PAEs above 95% were obtained for all the sample volumes investigated. So, preconcentration factors of 500 can be easily achieved by SPE of 1 L of sample and elution with 2 mL of methanol. Higher sample volumes were not investigated.

By drying the eluent with a nitrogen flow and redissolving the PAEs in 200 µL of methanol, concentration factors of 5000 and 2500 could be achieved for BBP and DBP by SPE of 1 and 0.5 L of sample, respectively. However, sample drying caused a strong retention of DEHP in the dried residue, which resulted in recoveries of about 60–70% for this phthalate. This problem was avoided by introducing the residue, reconstituted with 200 µL of methanol, in an ultrasonic bath for 10 min.

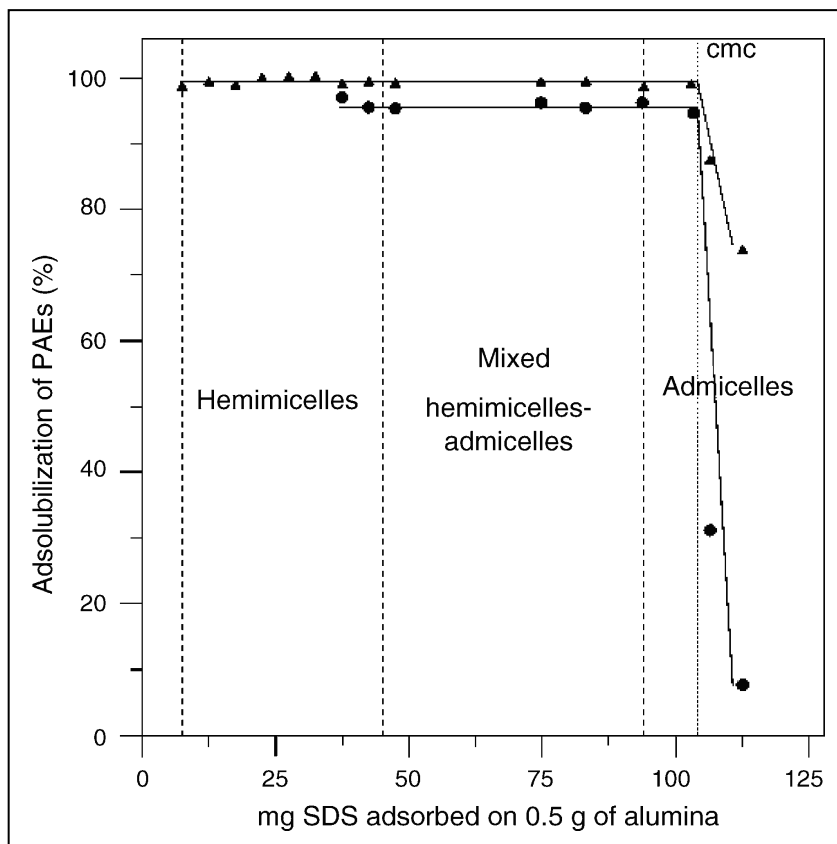


Figure 3. Effect of the amount of SDS adsorbed on alumina on the adsorbilization of (●) DEHP and (▲) BBP

3.3. Analytical performance

Calibration curves were run by injecting 50–5000 ng (absolute amount) of each PAEs under full scan conditions (m/z 270–400). No gains in sensitivity were achieved by reducing the m/z range to 10 (termed SIM mode in the operation of the Agilent system), which is logical considering how an ion trap works.⁽³²⁾ The slope of the calibration curves was $(1.74 \pm 0.04) \times 10^5$, $(4.25 \pm 0.02) \times 10^5$ and $(14.5 \pm 0.2) \times 10^5$ for BBP, DBP and DEHP, respectively. The minimum detectable amount (MDA), corresponding with the amount of chemical injected onto the LC column in a volume of 100 μ L standard solution that produced a 3:1 signal-to-noise ratio, was 18, 38 and 40 ng for BBP, DBP and DEHP, respectively. From these values and

[32]N.A. Yates, M.M. Booth, J.L. Stephenson, R.A. Yost, in: E.M. Raymon, J.F.J. Todd (Eds.), *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry*, CRC Press, New York, 1995, Chapter 4

considering the sample volume used for analysis of sewage (0.5 L), the methanol volume containing the analytes (200 μL) and the recovery obtained from spiked samples ($\sim 100\%$), the method detection limits were estimated to be 0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$ for BBP and 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DBP and DEHP. Similar method detection limits have been found using organic polymers as sorbents in SPE-LC/MS (e.g. 0.08 and 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DBP and DEHP, respectively⁽²⁰⁾) and SPME-LC/UV (e.g. 0.05 and 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for BBP and DEHP, respectively⁽¹⁸⁾). GC/MS reduces the detection limits for about one magnitude order (e.g. 0.007, 0.02 and 0.006 $\mu\text{g L}^{-1}$, for DBP, BBP and DEHP, respectively⁽¹⁴⁾). The overall performance of the analytical method, in terms of precision was evaluated by extracting six consecutive aqueous samples spiked with 1 μg of each target analyte. The relative standard deviation ranged from 2 to 5% demonstrating good method precision.

The possible interference arising from matrix components that could elute with PAEs causing ion suppression or space-charge effects on the ion trap was evaluated by comparison of the calibration curves obtained from standards and those obtained from wastewater influent and effluent samples fortified with known amounts of PAEs. Since the analytical characteristics of both types of calibration curves were similar, we recommended external calibration for determining phthalates in sewage. Nevertheless, it is advisable to check the influence of matrix components when the sample analyzed is expected to have a composition very different to those investigated here.

3.4. Analysis of phthalates in sewage

The performance of the method was tested by analyzing sewage samples from different wastewater treatment plants. Table 2 shows the results obtained. Except for some influent samples, the concentration of phthalates was in the low $\mu\text{g L}^{-1}$ range. The values found for these pollutants in wastewater samples were in the range previously reported by other authors.^(4-5,33) Figure 1(b-d) shows some of the MS extracted ion chromatograms obtained. The retention times and MS spectra for phthalates from analyzed samples and standard solutions were identical. Total method recoveries were assessed by analyzing the same samples spiked with a standard mixture of PAEs to give a final concentration of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DEHP and 10 or 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DBP and BBP in effluent and influent water samples,

[33]A. Gómez Hens, M.P. Aguilar-Caballós, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 847

respectively. As an example, the recoveries obtained for four samples are shown in Table 2. Recoveries above 88% were obtained for all samples analyzed. These recoveries were similar to those found for spiked distilled water.

Table 2. Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm standard deviation (based on three replicates) and recoveries (%) of PAEs found in wastewater influent and effluent samples

Sample ^a location	DBP	BBP	DEHP
WWTP Influent			
Puente Genil	62 \pm 6	<LOD	2.7 \pm 0.5
Lucena	22 \pm 2	<LOD	2.9 \pm 0.4
Arahal	7.1 \pm 0.7	<LOD	2.7 \pm 0.4
Bailén	<LOD	1.2 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3
Linares	6.6 \pm 0.4	0.5 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2
Spiked Puente Genil sample	98 ^b	103 ^b	88 ^c
Spiked Linares sample	89 ^b	96 ^b	96 ^c
WWTP Effluent			
Puente Genil	1.9 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	<LOD
Lucena	<LOD	<LOD	<LOD
Arahal	<LOD	<LOD	<LOD
Bailén	<LOD	<LOD	<LOD
Linares	0.5 \pm 0.1	0.76 0.05	<LOD
Spiked Bailén sample	88 ^d	96 ^d	90 ^c
Spiked Linares sample	99 ^d	92 ^d	93 ^c

^a Sample volume: 0,5 L (preconcentration factor = 2500) Level of fortification: ^b 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; ^c 1 $\mu\text{g L}^{-1}$; ^d 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ <LOD: Lower than the detection limit

4. Conclusions

This research is included in the framework of systematic investigations developed by our research group to prove the suitability of surfactant-coated mineral oxides as sorbents for the SPE of organic compounds. In this work, the combination of SDS hemimicelles-based SPE and LC-ion trap MS was found a valuable tool for the analysis of trace levels of phthalates in sewage. The strong hydrophobic interactions between the surface of hemimicelles and the target compounds resulted in their high retention (i.e. quantitative adsolubilization) and

high breakthrough volumes (at least 1 L of sample), which permitted to get high preconcentration factors (between 2500 and 5000).

The applicability of surfactant-coated mineral oxides to concentrate very different kind of compounds (e.g. ionic, apolar, amphiphilic) arises from the fact that very different mechanisms of retention of analytes can be exploited by changing surfactant concentration or their nature. A remarkable characteristic of the surfactant aggregates formed on the surface of mineral oxides is their easy disruption in the presence of organic solvents which allows to elute strongly retained compounds using low solvent volumes.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MCyT (Project BQU2002-01017). They also thank to the personnel from the following municipal WWTPs for kindly collecting the sewage water samples: Linares and Bailén (Jaén), Lucena (Córdoba) and Arahál (Sevilla). We specially thank to the Environmental Management and Services Company (EGEMASA) from Puentegeñil (Córdoba) its collaboration in providing us different type of wastewater samples.

PARTE I
CAPÍTULO 2

**POTENTIAL OF NON-IONIC
SURFACTANT-TEMPLATED
MESOPOROUS SILICA FOR THE
SOLID PHASE EXTRACTION OF
ORGANIC COMPOUNDS**

Potential of non-ionic surfactant-templated mesoporous silica for the solid phase extraction of organic compounds

(Submitted to Analytica Chimica Acta)

Francisco José López Jiménez, Soledad Rubio

Abstract

The potential of nonionic surfactant-templated mesoporous silica (MSU) for the extraction of organic compounds prior to liquid chromatography was examined for the first time. The approach was illustrated by studying the SPE of analytes in a wide polarity/charge range (e.g. phenols, herbicides and surfactants). Parameters affecting the extraction efficiency were assessed. The high surface area and the mixed mode mechanism (e.g. hydrogen bonding and ionic interactions) offered by the sorbent allowed the efficient extraction of polar and ionic compounds. Concentration factors in the range 50-100 were reached for these compounds without solvent evaporation. MSU materials were highly efficient for extraction of amphiphilic compounds because of the formation of cylindrical micelles into the hexagonal structure of the pores. Breakthrough volumes of 1250 mL were obtained for cationic surfactants using 0.1 g of sorbent. The strong adsorption of surfactants on MSU-1 permitted the easy modification of its hydrophilic surface at the required extent and added further mechanisms (e.g. dispersion and π - π interactions) for solute retention. Thus, the dodecyltrimethyl ammonium-functionalized MSU was proved to enhance the SPE of solutes not conveniently addressed by the naked MSU. The suitability of MSU materials for working under real conditions was checked by applying them to the extraction of benzalkonium surfactants (BAS) from raw and treated sewage and river water. The

concentrations of BAS found ranged between 0.12 and 24 $\mu\text{g L}^{-1}$. Recoveries from spiked samples ranged from 93 to 101%. MSU materials are excellent candidates for multiresidue extractions because of their high surface area and the mixed-mode mechanisms and template effects they offer for solute retention.

1. Introduction

Ordered mesoporous silica, formed from silica precursors and amphiphiles and subsequent removal of the latter by calcination or solvent extraction, have attracted wide interest since their discovery in 1992 by Mobil researchers^(1,2). The stereoregular arrangement of channels in their structure mimic the supramolecular aggregate (micelle, microemulsion, vesicle, liquid crystal, etc) used in their preparation. Relevant mesoporous materials have been obtained from ionic surfactants (e.g. the highly ordered hexagonal MCM-41, cubic MCM-48 and lamellar MCM-50)⁽¹⁻³⁾, non-ionic primary amines (HMS materials) or surfactants (MSU-X silica)⁽⁴⁾, and amphiphilic di- and tri-block copolymers (SBA materials)⁽⁵⁾.

Mesoporous silica have unique properties desirable for adsorption; they possess high specific surface area (up to 1600 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), regular and tunable pore sizes in the range 2-50 nm, large pore volumes and active pore surfaces for modification or functionalization. As a result, these materials have been extensively studied as advanced adsorbents and hundreds of papers have been published related to their use in pollution control⁽⁶⁾, gas storage⁽⁷⁾ and bioadsorption⁽⁸⁾. An excellent review including the use of mesoporous materials as sorbents in sample preparation for chemical analysis has been recently reported⁽⁹⁾. Main applications include preconcentration of metal ions using functionalized MCM-41 and SBA-15, protein digestion by enzymes immobilized on the mesoporous material, size-selective enrichment of endogenous peptide and proteins, and isolation/enrichment of phosphorylated peptides or proteins from biological samples prior to MS analysis. Surprisingly, extraction/enrichment of organic compounds with mesoporous

[1] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature*, 359 (1992) 710

[2] J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.-W. Chu, D.H. Olson, E.W. Sheppard, S. B. McCullen, J.B. Higgins, J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834

[3] Q. Huo, R. Leon, P. Petroff, G.D. Stucky, *Science* 268 (1995) 1324

[4] S.A. Bagshaw, E. Prouzet, T.J. Pinnavaia, *Science* 269 (1995) 1242

[5] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science* 279 (1998) 548

[6] Z. Wu, D. Zhao, *Chem. Commun.* 47 (2011) 3332

[7] Y. Ren, Z. Ma, P.G. Bruce, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4909

[8] M. Hartmann, *Chem. Matter.* 17 (2005) 4577

[9] L. Zhao, H. Qin, R. Wu, H. Zou, *J. Chromatogr.A* 1228 (2012) 193

materials has been scarcely explored to date despite their known excellent adsorption properties towards this type of compounds. Applications have mainly focused on the use of MCM-41 for the in-line enrichment of volatile organic compounds prior to their gas chromatography separation⁽¹⁰⁾ and as fiber coatings for the solid-phase microextraction of aromatic hydrocarbons⁽¹¹⁾, toluene, p-xylene, biphenyl and anthracene⁽¹²⁾ and bisphenol A⁽¹³⁾.

A key issue for the applicability of mesoporous silicas in SPE is their pore accessibility which conditions mass transfer and pore blockages during use. Three dimensional pore structures, such as MCM-48, present better pore accessibility than unidirectional structures, such as MCM-41 or SBA-15, which have long, non-intersecting pores that impose mass-transfer limitations in the less accessible parts of the channels⁽¹⁴⁾. On the other hand, the wormhole-like structured materials, such as MSU-X, with highly interconnected pores and small domain sizes, provide short diffusion paths for the analytes in the framework channels. They have proved to be more active heterogeneous catalysts than their ordered hexagonal analogues owing to the readily access of guest molecules to the reactive centres that have been designed into the framework surfaces⁽¹⁵⁾. So, MSU-X materials have the potential to be the most convenient sorbents for SPE among mesoporous silica. To the best of our knowledge, MSU-X materials have been proposed as stationary phases in LC⁽¹⁶⁾ but no applications in SPE have been reported. The letter X (X=1-4) refers to the structure of the non-ionic surfactant used as template in the synthesis of the MSU material, namely alkyl polyethyleneoxide (PEO), alkylaryl PEO, polypropyleneoxide PEO block copolymers or ethoxylated derivatives of sorbitan fatty esters (Tween), respectively.

In this work, the ability of MSU-1 sorbents to retain a variety of solutes based on their high surface area and the hydrogen bonding and ionic interactions provided by the silanol groups on their surface was investigated. Also, the additional template effect of the mesostructured material towards surfactants of different nature was assessed. The 23 solutes selected for this study included phenols,

[10] Y.C. Su, H.M. Kao, J.L. Wang, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5643

[11] J. Hou, Q. Ma, X. Du, H. Deng, J. Gao, *Talanta* 62(2004) 241

[12] D. Xin-Zhen, W. Ya-Rong, T. Xiao-Juan, D. Huang-Ling, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 9

[13] F. Yi, F. Yu-Qi, S. Zhi-Guo, W. Jian-Bo, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 1


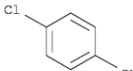
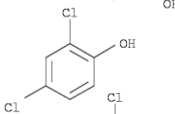
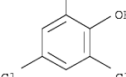
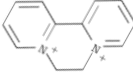
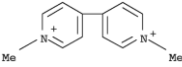
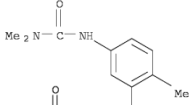
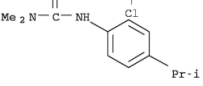
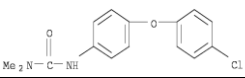
[14] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends in Anal. Chem.* 22 (2003) 470

[15] S-S. Kim, T.R. Pauly, T.J. Pinnavaia, *Chem. Commun.* (2000), 835

[16] C. Boissiere, M. Kummel, M. Persin, A. Larbot, E. Prouzet, *Adv. Funct. Mater.* 11 (2001) 129

chlorophenols, ammonium quaternary and phenylurea herbicides, and non-ionic, cationic and anionic surfactants. Table 1 shows their structure and some physico-chemical parameters relevant for SPE. A detailed study of the parameters affecting the SPE sequence of the different compounds was carried out. For comparison, the SPE of these solutes was also performed using commercial silica as a sorbent. The possibility of using MSU-1 as a support for the formation of supramolecular sorbents was assessed and its suitability for extracting pollutants from both polluted and natural water samples was checked. Below the main results are outlined.

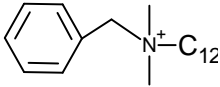
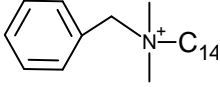
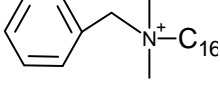



Table 1. Target pollutants and their properties

Target pollutants	Abbreviature	Structure	Log Kow	pKa	Donor/ Acceptor Protons
Phenols					
Phenol	Phenol		1.54 ^a	9.86 ^a	1/1 ^a
4-Chlorophenol	4-CP		2.42 ^a	9.47 ^a	1/1 ^a
2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP		3.10 ^a	8.05 ^a	1/1 ^a
2,4,6-Trichlorophenol	2,4,6-TCP		3.77 ^a	6.59 ^a	1/1 ^a
Quaternary ammonium herbicides					
Diquat	DQ		-4.6 ^b	—	0/2 ^d
Paraquat	PQ		-4.5 ^b	—	—
Phenyl urea herbicides					
Chlortoluron	CT		2.41 ^a	0.08- 14.41 ^a	3/1 ^a
Isoproturon	IP		2.89 ^a	0.85- 15.06 ^a	3/1 ^a
Chloroxuron	CX		3.2 ^a	0.42- 14.37 ^a	4/1 ^a

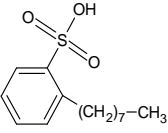
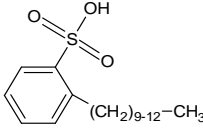
Non ionic surfactants

Triethylene glycol monodecyl ether	C ₁₀ (EO) ₃	C ₁₀ -[Et-O] ₃ -OH	3.42 ^a	14.36 ^a	4/1 ^a
Decaethylene glycol monododecyl ether	C ₁₂ (EO) ₁₀	C ₁₂ -[Et-O] ₁₀ -OH	2.79 ^a	14.36 ^a	11/1 ^a
Tetraethylene glycol monotetradecyl ether	C ₁₄ (EO) ₄	C ₁₄ -[Et-O] ₄ -OH	4.46 ^a	14.36 ^a	4/1 ^a

Cationic surfactants

Benzyl dodecyl dimethyl ammonium bromide	BDDAB		1.69 ^d	—	0/1 ^c
Benzyl tetradecyl dimethyl ammonium bromide	BTDAB		2.28 ^d	—	0/1 ^d
Benzyl hexadecyl dimethyl ammonium chloride	BHDAC		4.41 ^d	—	0/1 ^d
Dodecyltrimethyl ammonium bromide	DTAB		0.43 ^d	—	0/1 ^d
Tetradecyltrimethyl ammonium bromide	TTAB		1.25 ^d	—	0/1 ^d
Hexadecyldimethyl ammonium bromide	HTAB		2.06 ^d	—	0/1 ^d

Anionic surfactants

Octylbenzene sulphonate	C ₈ -LAS		3.40 ^d	—	1/3 ^d
Petralab P-550	C ₁₀ -C ₁₃ LAS				
Decylbenzene sulphonate (9.6%)			4.42 ^d	—	1/3 ^d
Undecylbenzene sulphonate (38.1%)			6.24 ^d	—	1/3 ^d
Dodecylbenzene sulphonate (31.3%)			6.78 ^d	—	1/3 ^d
Tridecylbenzene sulphonate (19.1%)			7.31 ^d	—	1/3 ^d

Calculated values obtained from ^a<http://scifinder.cas.org> ^b<http://sitem.herts.ac.uk>
^c<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> ^d<http://www.chemspider.com>

2. Experimental

2.1. Reagents

All reagents were of analytical grade and were used as supplied. Tetraethoxysilane (TEOS) (Aldrich, Milwaukee, WI) and polyoxyethylene 10 lauryl ether ($C_{12}(EO)_{10}$) (Sigma, St. Louis, MO) were used for the synthesis of the mesoporous silica MSU-1. Phenols were obtained from the following sources: Phenol and 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) from Aldrich, and 4-chlorophenol (4-CP) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) from Merck (Darmstadt, Germany). The herbicides diquat (DQ), chlortoluron (CT), isoproturon (IP) and chloroxuron (CX) were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), and paraquat (PQ) from Aldrich. The non-ionic surfactants triethylene glycol monodecyl ether $C_{10}(EO)_3$ and tetraethylene glycol monotetradecyl ether $C_{14}(EO)_4$ were obtained from Sigma. Cationic surfactants were supplied by Aldrich (dodecyltrimethyl ammonium bromide, DTAB; tetradecyltrimethyl ammonium bromide, TTAB; hexadecyldimethyl ammonium bromide, HTAB; benzyl dodecyl dimethyl ammonium bromide, BDDAB; benzyl tetradecyl dimethyl ammonium bromide, BTDAB; benzyl hexadecyl dimethyl ammonium chloride, BHDAB). The anionic surfactant (octylbenzene sulphonate; C_8 -LAS) was purchased from Aldrich. Also, a commercial mixture C_{10} - C_{13} LAS, Petrelab P-550, was provided by Massó and Carol (Barcelona, Spain). Ammonium, formic acid and HPLC-grade acetonitrile and methanol were supplied by Panreac (Sevilla, Spain), and heptafluorobutyric acid (HFBA) by Aldrich. Silica gel was obtained from Aldrich: (surface area $300\text{ m}^2\text{g}^{-1}$, point of zero charge (pcz) 2.8-3, particle diameter range 250-500 μm , mean pore size 150 Å and pore volume $1.15\text{ cm}^3\text{g}^{-1}$)

2.2. Synthesis and characterization of MSU-1

MSU-1 silica was synthesized according to the procedure described by Pinnavia et al.⁽⁴⁾. In a typical synthesis, 8.2 g of $C_{12}(EO)_{10}$ were dissolved in 200 mL of milli-Q water. Then 44.6 mL of TEOS were dispersed in this solution using vigorous stirring. A milky emulsion was obtained after 2-3 min. The mixture was stirred for 16 h at room temperature and the white powder obtained was filtered, washed with Milli-Q water, and air-dried for 24 h. Finally, it was calcined at 600°C for 4 h in order to remove the surfactant from the framework channels. An amount

of MSU-1 of 9 ± 0.5 g was obtained under these experimental conditions. The structure of the material was confirmed by powder x-ray diffraction (XRD) using a D5000 Siemens diffractometer equipped with a rotating anode and $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.15418$ nm). The XRD pattern of the calcined MSU-1 (Figure 1) exhibited a single narrow peak assigned to the pore centre to centre correlation length, characteristic of a wormhole structure of the porous framework of MSU compounds⁽⁴⁾.

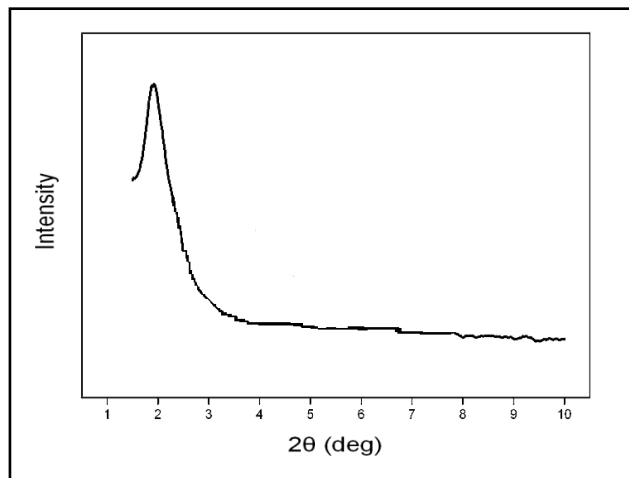


Figure 1. Powder XRD pattern of MSU-1 silica calcined at 600°C for 4 h

2.3. Adsorption of pollutants on MSU-1

The retention ability of MSU-1 for organic pollutants was assessed using a variety of experimental conditions. In a typical experiment, variable amounts of MSU-1 (0.01-1 g) were mixed with a 25 mL aqueous solution containing single model analytes (16-100 mg L⁻¹ phenol; 15-25 mg L⁻¹ diquat; 100-120 mg L⁻¹; chlortoluron; 10-30 mg L⁻¹ C₁₂(EO)₁₀; 1-10 mg L⁻¹ BDDAB; 20 mg L⁻¹ C₈-LAS) at different pH (2-12) and ionic strength (0.025-1M NaCl) values. The mixture was stirred for 5 min and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Then, the concentration of analytes in the supernatants was measured as follows. UV detection at 269, 308, 245 and 225 nm was used to quantify phenol, diquat, chlortoluron and C₈-LAS, respectively. Quantification of C₁₂(EO)₁₀ was based on the mixed aggregate method⁽¹⁷⁾, using dodecylsulphate as titrant and the anionic dye Coomassie Brilliant

[17] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 125 (2000) 1507

Blue G (CBBG) as a photometric probe at 620 nm. A colorimetric method, based on the formation of ion pairs between BDDAB and the dye disulphine blue (1.3×10^{-3} M) and extraction into chloroform was used for quantification of the cationic surfactant^(18,19). Linearity for phenol, diquat, chlortoluron, $C_{12}(EO)_{10}$, BDDAS and C_8 -LAS was in the intervals: 8-80; 1.3-15; 5-100, 4-40; 0.6-2 and 2-20 mg L⁻¹, respectively.

2.4. MSU-1-based SPE

The target pollutants were subjected to SPE in order to determine the composition and volume of eluents as well as breakthrough volumes. Cartridge columns were filled with amounts of MSU-1 between 0.1 and 0.5g and conditioned with 10 mL of Milli-Q water. Methanol and acetonitrile (0.5-2 mL) were investigated as eluents of analytes. Breakthrough experiments were conducted by passing increasing volumes (0.01-1 L) of an aqueous solution at pH 7 (studies involving LAS were carried out at pH 2) containing fixed amounts of mixture of analytes. The following six groups of compounds were studied separately: phenols (including phenol, 4-CP, 2,4-DCP and 2,4,6-TCP), ammonium quaternary (DQ and PQ) and phenylurea (CT, IP, CX) herbicides, and non-ionic ($C_{10}(EO)_3$, $C_{12}(EO)_{10}$, $C_{14}(EO)_4$), cationic (BDDAB, BTDAB, BHDAB, DTAB, TTAB, HTAB) and anionic (C_8 -LAS, C_{10} - C_{13} LAS) surfactants. Analytes in the elution solution were separated and quantified using liquid chromatography and UV or MS detection. For this purpose, a LC/ion trap MS (1100 series LC/MSD, Agilent Technologies, Waldbronn Germany), equipped with ESI and APCI ionization sources was used. Table 2 shows the chromatographic conditions used for separation of the pollutants under study and Table 3 gives information on the detection systems utilized and the linear ranges and detection limits achieved. Quantification of non-ionic and anionic surfactants was carried out under full scan conditions by measuring the peak areas of the extracted molecular ion chromatograms at the m/z values corresponding to the ions obtained from the different oligomers and isomers, respectively. Parallel SPE experiments using silica as a sorbent were carried out in order to compare SPE recoveries with those obtained from MSU-1.

[18]H. K. Biswas, B. M. Mandal, *Anal.Chem.* 44 (1972)1636

[19]Q. W. Osburn, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59 (1982) 453

Table 2. Chromatographic conditions for separation of target pollutants

Target pollutants ^a	Analytical column	Mobile phase	Elution gradient program
Phenols Phenol, 4-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	15 cm Hypersil C18 (5 µm particle diameter, 4.6 mm i.d) supplied by Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain)	A: Methanol; B: Water	0-10 min (linear gradient from 50% to 70% of A); 10-15 min (linear gradient to 100% of A). Flow 0.8 ml/min
Herbicides DQ, PQ	25 cm Nova Pack C8 (5 µm particle diameter, 3.5 mm i.d) supplied by Waters (Milford, MA)	A: Acetonitrile/water (75:25); B: Heptafluorobutyric acid (25mM)	0-20 min (linear gradient from 15% to 35% of A); 20-25 min (linear gradient to 100% of A). Flow 0.6 ml/min
CT, IP, CX	15 cm Hypersil C18 (5 µm particle diameter, 4.6 mm i.d) supplied by Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain)	A: Acetonitrile; B: Water	0-30 min (linear gradient from 40% to 60% of A). Flow 0.8 ml/min
Non ionic surfactants C ₁₀ (EO) ₃ , C ₁₂ (EO) ₁₀ , C ₁₄ (EO) ₄	15 cm Zorbax Eclipse XDB-C8 (5 µm particle diameter, 4.6 mm i.d) supplied by Agilent (Waldbronn, Germany)	A: Acetonitrile/methanol (50:50); B: Water. Both containing 1.5% ammonium acetate	0-5 min (isocratic conditions with 70% of A); 5-25 min (linear gradient from 70% to 95% of A). Flow 0.8 ml/min
Cationic surfactants BDDAB, BTDAB, BHDAB, DTAB, TTAB, HTAB	15 cm Hypersil C18 (5 µm particle diameter, 4.6 mm i.d) supplied by Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain)	A: Methanol; B: Formiate ammonium (50mM), pH 3.5	0-30 min (linear gradient from 70% to 90% of A). Flow 0.8 ml/min
Anionic surfactants C ₈ -LAS, C ₁₀ -C ₁₃ LAS	15 cm Hypersil C18 (5 µm particle diameter, 4.6 mm i.d) supplied by Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain)	A: Methanol; B: Water	0-15 min (isocratic conditions with 85% of A). Flow 0.8 ml/min

^a for meaning of acronyms see section 2.1

2.5. Adsorption isotherms for DTAB and C₁₂(EO)₁₀ on MSU-1

Both, a cationic and a nonionic surfactant were selected as models to explore the potential of MSU-1 as a support for the formation of supramolecular sorbents. Adsorption isotherms were obtained by adding variable amounts of DTAB (0.5-500 mg) or C₁₂(EO)₁₀ (0.5-200 mg) to an aqueous suspension containing 0.5 g of MSU-1. The pH of the different solutions was adjusted to 7 and the final aqueous volume of the solution was 25 and 50 mL for DTAB and C₁₂(EO)₁₀, respectively. After vigorous stirring of the solutions for 5 min, the mixtures were centrifuged at 5000 rpm for 5 min and the concentrations of DTAB or C₁₂(EO)₁₀ in the supernatants were determined by LC/(ESI-IT)MS. The chromatographic and detection conditions used for quantitation are specified in Tables 2 and 3.

Table 3. Detection parameters and calibration data for the analytical methods used for quantification

Target pollutants ^a	Detector	Parameter set for quantitation	Linear range (ng inject) ^b	LOD range ^c (ng)
Phenols Phenol; 4-CP; 2,4-DCP; 2,4,6-TCP	UV	$\lambda = 210 \text{ nm}$	200 – 2000	40-60
Quaternary ammonium herbicides DQ; PQ	ESI(+)-MS	Cap. Voltage (-4.5 kV); Cap. Exit Voltage (80 V); Skimer (40 V); Trap drive (42); Source Temp. (350 °C); Drying gas (10 L/min); Nebuliser gas (80 p.s.i); Max. Accumulation time (50 ms); m/z: DQ (184 M+, 183 [M-H] ⁺); PQ(186 M+, 185 [M-H] ⁺)	5—200	0.1-1
Phenyl urea herbicides CT; IP; CX	UV	$\lambda = 245 \text{ nm}$	100— 2000	15-30

Non ionic surfactants C ₁₀ (EO) ₃ ; C ₁₂ (EO) ₁₀ ; C ₁₄ (EO) ₄	APCI(+)- MS	Cap. Voltage (3.5 kV); Corona discharge current (4000 nA); Cap. Exit Voltage (180 V); Skimer (25 V); Trap drive (50); Source Temp. (300 °C); Vaporizer temperature (350 °C); Drying gas (1 L/min); Nebuliser gas (50 p.s.i); Ion charge control (20000); [M+NH ₄] ⁺ m/z: C ₁₀ (EO) ₃ (291; 308; 322); C ₁₂ (EO) ₁₀ (424; 468; 512; 556; 600; 644; 688; 732; 776; 820; 864; 908); C ₁₄ (EO) ₄ (391; 408; 422)	2 — 2000	0.4-0.6
Cationic surfactants BDDAB; BTDAB; BHDAC; DTAB; TTAB; HTAB	ESI(+)-MS	Cap. Voltage (-4.5 kV); Cap. Exit Voltage (80 V); Skimer (40 V); Trap drive (42); Source Temp. (350 °C); Drying gas (10 L/min); Nebuliser gas (80 p.s.i); Max. Accumulation time (50 ms); Ion Charge Control 50000; [M+H] ⁺ m/z: BDDAB (304); BTDAB (332); BHDAC (360) DTAB (228); TTAB (256); HTAB (284)	0.2 – 20	0.04-0.06
Anionic surfactants C ₈ -LAS ; C ₁₀ -C ₁₃ LAS	ESI(-)-MS	Cap. Voltage (3.0 kV); Cap. Exit Voltage (80 V); Skimer (40 V); Trap drive (42); Source Temp. (350 °C); Drying gas (10 L/min); Nebuliser gas (80 p.s.i); Max. Accumulation time (50 ms). Ion Charge Control 50000; [M-H] ⁻ m/z: C ₈ -LAS(283); C ₁₀ -LAS (297); C ₁₁ -LAS (311); C ₁₂ -LAS (325); C ₁₃ -LAS (339)	2—200	0.5

^a For meaning of acronyms see section 2.1

^b Injection volume: 20 µl ^cobtained as a signal-to-noise ratio of 3

2.6. Procedure for the determination of benzalkonium surfactants (BASs) in sewage and river water

MSU-1 was used for extracting BASs from environmental waters in order to evaluate its applicability to real-world samples. Sewage influents and effluents were collected from the municipal wastewater treatment plants (WWTPs) of Mengibar and Bailén, in the South of Spain, in June 2011. Mengibar WWTP receives domestic effluents whereas Bailén WWTP receives ~20-40% of industrial effluents, mainly from brickworks, ceramic and olive oil industries. River samples were taken from the Guadalquivir flowing by Jaén province (about 1 km downstream of a paper industry) in June 2011. Samples were collected in dark glass containers. Immediately they were filtered through 0.45 μm filters (Whatman GF/F, Osmonics, France) in order to remove suspended solids, and then they were adjusted to pH 2 by the addition of concentrated hydrochloric acid to avoid microbiological growth. Finally, they were stored at 4°C until analysis.

Mesoporous-based SPE of BASs was carried out by (a) filling 6-mL plastic-cartridges (Bond Elut Jr. by Varian) with 100 mg of MSU-1, (b) conditioning the solid with 10 mL of Milli-Q water, (c) filtering the samples (1250 mL of river, 500 mL of WWTP-effluent or 250 mL of WWTP-influent) in a SPE manifold (Supelco, Bellefonte, PE, USA) connected to a vacuum pump (Eyela A35, Rikakikai Co., Tokyo) at an approximated flow rate of 20 mL min⁻¹ and (d) eluting the retained BASs with 1 mL of methanol. An aliquot (20 μL) of eluates was directly analyzed by LC/(ESI⁺-IT)-MS. The stationary phase was a 15 cm Zorbax Eclipse XDB-C₈ column (5 μm particle diameter and 4.6 mm i.d) supplied by Agilent (Walddbronn, Germany). Methanol and 50 mM ammonium formate buffer (pH 3.5) were used as eluents at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The elution gradient program was as follows: 0-30 minutes, linear gradient from 70 to 90% of methanol; 30-45 minutes, isocratic conditions with methanol/ammonium formate 90:10. The diver valve was programmed to send mobile phase containing most polar matrix compounds to waste. So, only 7 minutes after the initiation of the elution gradient program, the eluted components were sent to the ESI source.

Analysis of BASs was carried out using the same MS parameter values than those specified for cationic surfactants in Table 3, except for the following parameters: capillary exit (106 V), Skimmer (30 V), trap drive (30). Calibrations were

run under full-scan conditions (m/z scan range, 200-400). Homologues were quantified in all cases from the corresponding peak areas of extracted ion chromatograms. Smooth chromatograms were obtained by using the Gauss function (width, 2 points; cycles, 2). Correlation between peak areas and homologue concentrations (0.2-20 ng, absolute amount injected) were determined by linear regression and were in the range 0.995-0.9991. The cationic surfactant N-dodecylpyridinium chloride (4 ng, absolute amount injected) was added to standards and samples just prior instrumental analysis in order to be used as an internal standard for quantification. Structural identification of BASs was performed by MS/MS experiments after the parent ion was isolated and fragmented by using the ion trap mass spectrometer⁽²⁰⁾. The isolation width was set to 4 m/z units, and the resonance excitation was set to 1.1 V. Excitation of the ions was accomplished through collisions with helium.

3. Results and discussion

3.1. MSU-1-based SPE

Both structure and surface properties render mesoporous materials interesting for sample preparation. Thus, silanol groups in the surface provide active sites for the physical adsorption of molecules through hydrogen bonding or ionic interactions. Also, the templating effect expected for structure-directing surfactants should benefit the adsorption of a variety of amphiphilic molecules. On the other hand, the size exclusion of large molecules from the highly ordered and sized-controlled mesoporous structure should enable selectivity for the quantitation of low-molecular weight compounds. Below, potential applications of these materials to the SPE of organic compounds are investigated.

3.1.1. Retention based on solute-sorbent hydrogen bonding: influence of hydrophobic and template effects.

Phenols, phenyl urea herbicides and non-ionic surfactants (Table 1) were selected as models to study the SPE of analytes on MSU-1 based on hydrogen bonding. The influence of hydrophobic effects on the characteristics of the SPE was

[20] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 998 (2003) 143

also investigated. Likewise, the probable templating effect for retention of non-ionic surfactants is discussed.

Figure 2 shows the retention of (A) phenol and (B) the surfactant used for the synthesis of the sorbent ($C_{12}(EO)_{10}$) on MSU-1, as a function of different variables. $C_{12}(EO)_{10}$ was strongly retained on MSU-1; amounts of material so low as 10 mg were able to adsorb around 80% of the surfactant. Retention was quantitative from 100 mg of the sorbent in the whole range of pH. Adsorption was independent of the concentration of salt, at least up to 1M. Formation of cylindrical micelles on the MSU-1 pores, through hydrogen bonding with silanol groups and strong hydrophobic lateral interactions among hydrocarbon chains, restored the supramolecular aggregate that served as template for the sorbent structure.

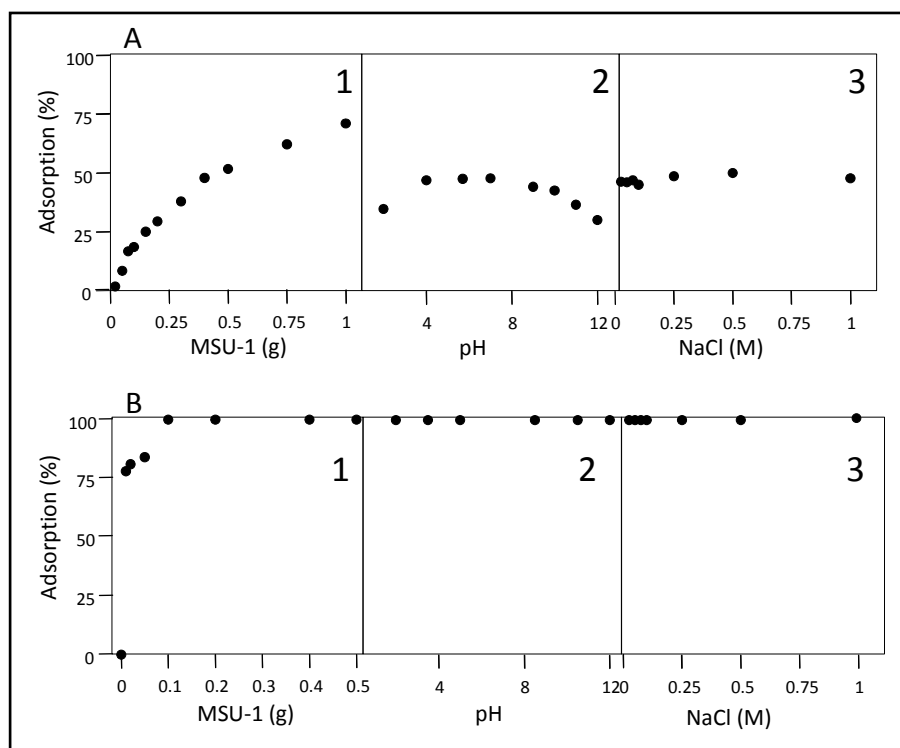


Figure 2. Percentage of adsorption of (A) phenol (100 mg L^{-1}) (B) polyoxyethylene 10 lauryl ether, $C_{12}(EO)_{10}$ (120 mg L^{-1}) and (C) C8-LAS (20 mg L^{-1}) on MSU-1 as a function of (1) concentration of sorbent, (2) pH and (3) concentration of sodium chloride. See section 2.3. for experimental

The high surface area of MSU-1 and the hydrogen bonding interactions it provides was not enough to quantitatively adsorb very polar compounds such as phenol (Figure 2A) although retention was independent of salt concentration.

Optimal pH was in the range 4-9, indicating that phenol (pKa 9.86) and silanols (pcz ~3) were the donor and acceptor protons respectively.

Breakthrough volumes for different phenols, phenyl urea herbicides and non-ionic surfactants were determined using cartridge columns filled with MSU-1 and filtering different volumes of aqueous solutions. Parallel experiments were run using commercial silica. The maximal adsorption obtained in batch experiments was taken as a reference in breakthrough studies for analytes not quantitatively adsorbed. A maximal amount of sorbent of 0.5 g was considered for breakthrough assessment. Breakthrough studies for nonionic surfactants were conducted using 0.1g of sorbent. Representative results are shown in Table 4. A breakthrough volume of 100 mL was obtained for all the target compounds. Recoveries were independent of the concentration of analyte; see as an example the results obtained for phenols at 1 and 100 µg L⁻¹ in Table 4.

Table 4: Recoveries and standard deviations (n=3) for the SPE of phenols^a, phenylurea herbicides^a and alkyl polyethylene oxides^a on MSU-1 and silica as a function of the concentration of analyte and volume of sample

Sorbent	Analyte conc. (µg L ⁻¹)	Sample volume (mL)	Recovery ± standard deviation (%)			
			^d Phenol	^d 4-CP	^d 2,4-DCP	^d 2,4,6-TCP
^b MSU-1	100	100	51±3	74±2	77±1	80±2
	100	200	26±2	54±3	65±2	70±1
	1	200	24±2	57±2	67±2	72±3
^b Silica	100	50	^e nd	^e nd	7±1	25±1
	1	50	^e nd	^e nd	^e nd	^e nd
			^d CT	^d IP	^d CX	
^b MSU-1	100	100	78±2	77±3	80±2	
^b Silica	100	100	37±2	30±2	38±3	
			C₁₀(EO)₃	C₁₂(EO)₁₀	C₁₄(EO)₄	
^c MSU-1	100	100	99±4	100±3	96±4	
	100	500	48±3	45±2	49±3	
^b Silica	100	200	17±5	42±4	48±3	

^a For meaning of acronyms see section 2.1

^b 0.5 g ^c 0.1 g

^d Maximal adsorption in batch experiments using 0.5 g of MSU-1: P=49.2±2; 4CP=75±2; 2,4-DCP=79±2; 2,4,6-TCP=81±2; CT=79±3; IP=76±2; CX=80±2

^e Non-detected

Recoveries for phenols increased with hydrophobicity and kept practically constant for herbicides, probably because of their number of proton donors (Table 1). The SPE behaviour of nonionic surfactants was independent of the chain length and number of oxyethylene units because of their strong tendency to self-assemble onto the pores of the material. Silica was a bad sorbent for phenols and somewhat better for non-ionic surfactants because of the formation of hemimicelles on the surface, which would explain the dependence of recoveries on the chain length.

Methanol was more effective than acetonitrile for elution of solutes. Elution was quantitative for phenols and herbicides using 2 mL of methanol (MSU-1= 0.5 g). Non-ionics were eluted with 0.5 mL of methanol (MSU-1=0.1g).

It can be inferred from this study that MSU materials adsorb polar solutes (e.g. phenols and phenyl urea herbicides) much more effectively than conventional silica because of their larger surface area. Concentration factors around 50-100 are expected in conventional SPE for polar compounds without solvent evaporation. Concentration factors can considerably increase in batch-based experiments (e.g. using magnetic materials covered by MSU as a sorbent⁽²¹⁾). On the other hand, MSU-1 was an excellent sorbent for non-ionic surfactants which formed cylindrical micelles into the pores, thus recovering the structure of the mesoporous material prior to its calcination. The strong template effect permitted the complete adsorption of the surfactants using 0.1 g of sorbent. Concentration factors of 200 were reached under the proposed conditions without solvent evaporation.

3.1.2. Retention based on solute-sorbent ionic interactions: influence of hydrophobic and template effects.

The cationic herbicides diquat and paraquat and cationic and anionic surfactants (Table 1) were selected as models to study the SPE of analytes on MSU-1 based on ionic interactions. The influence of both hydrophobic and template effects on their retention was also considered.

Figure 3 shows, as an example, the retention on MSU-1 of (A) diquat, (B) BDDAB and (C) C₈-LAS as a function of different variables. The solute-sorbent electrostatic attraction allowed the complete retention of the herbicide and the

[21] J.M. Rosenholm, J. Zhang, W. Sun, H. Gu, *Microporous Mesoporous Mater.* 145 (2011) 14

cationic surfactant at sorbent amounts of 0.2 (Fig. 3A1) and 0.1 g (Fig.3B1) respectively. Retention was maximal from pH around 4 and independent of the amount of salt up to 1 M. As it was expected, anionic surfactants preferentially adsorbed on MSU-1 at pH values at which SiOH_2^+ groups were present on the sorbent surface (Fig. 3C2). However, it was necessary 1 g or sorbent to reach retention percentages around 80%. Retention for LAS was also independent of the ionic strength of the solution (Fig. 3C3).

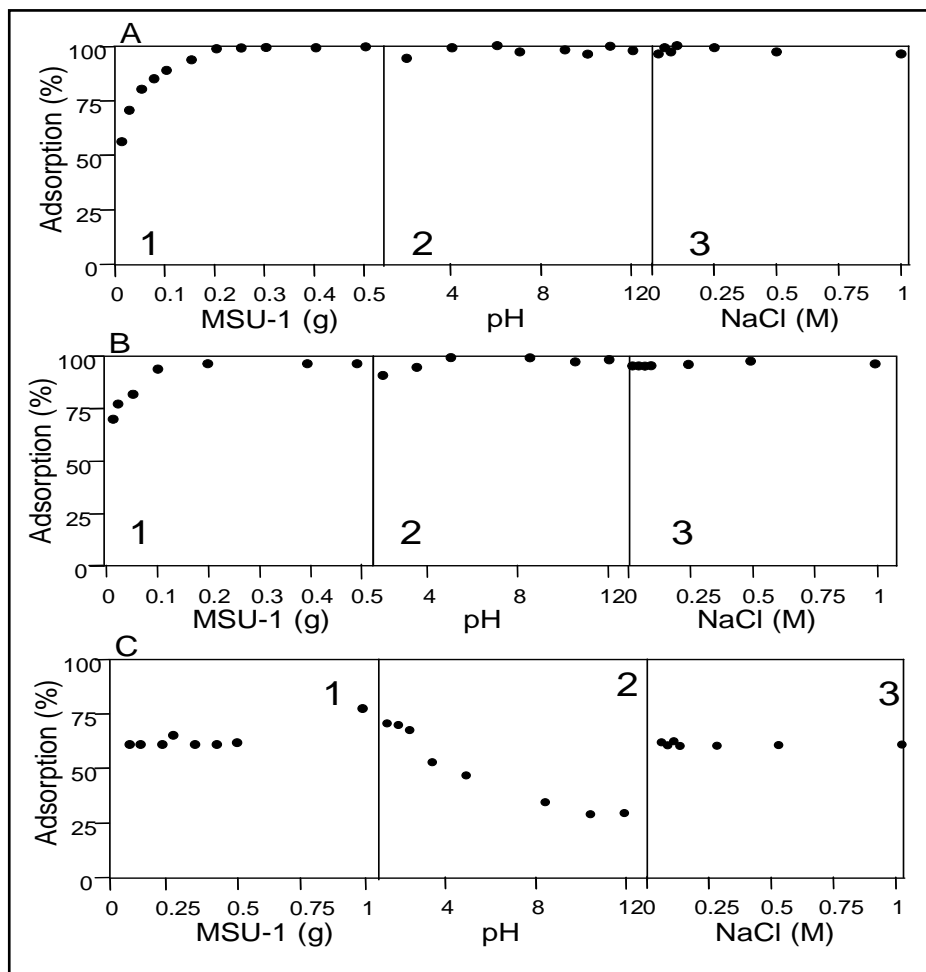


Figure 3. Percentage of adsorption of (A) diquat (15 mg L^{-1}) and (B) benzyldodecyldimethyl ammonium bromide, BDDAB (10 mg L^{-1}) on MSU-1 as a function of (1) the concentration of sorbent, (2) pH and (3) concentration of sodium chloride. See section 2.3. for experimental conditions.

Table 5: Recoveries and standard deviations (n=3) for the SPE of herbicides^a and anionic^a and cationic^a surfactants on MSU-1 and silica as a function of the concentration of analyte and volume of sample

Sorbent	Sample volume (mL)	Recovery \pm standard deviation (%)									
		^e DQ	^e PQ	^f C ₈ -LAS	^f C ₁₀ -C ₁₃ LAS	^g BDDAB	^g BTDAB	^g BHDAC	^g DTAB	^g TTAB	^g HTAB
^b MSU-1	50	94 \pm 1	98 \pm 2								
	100	69 \pm 1	68 \pm 1								
	200	19 \pm 1	21 \pm 1								
	500			63 \pm 2	64 \pm 3						
^b Silica	50	88 \pm 2	86 \pm 2								
	100	59 \pm 1	46 \pm 3								
	200	20 \pm 1	13 \pm 2								
	500			45 \pm 1	41 \pm 1						
^c MSU-1	50	95 \pm 2	97 \pm 2								
	100	56 \pm 1	49 \pm 1								
	200	16 \pm 1	24 \pm 1								
^c Silica	50	71 \pm 2	67 \pm 2								
	100	35 \pm 1	28 \pm 1								
	200	^h nd	^h nd								
^c MSU-1	100	101 \pm 2	103 \pm 3	99 \pm 2	98 \pm 3	96 \pm 3	99 \pm 3				
	250	98 \pm 2	100 \pm 2	97 \pm 3	101 \pm 1	97 \pm 2	96 \pm 3				
	500	94 \pm 3	97 \pm 2	98 \pm 1	97 \pm 3	99 \pm 2	100 \pm 1				
^c Silica	100	88 \pm 3	95 \pm 3	98 \pm 3	83 \pm 2	91 \pm 3	93 \pm 2				
	250	77 \pm 1	85 \pm 2	95 \pm 3	74 \pm 1	82 \pm 2	90 \pm 3				
	500	33 \pm 1	38 \pm 1	42 \pm 1	21 \pm 1	26 \pm 1	34 \pm 1				
^d MSU-1	100	99 \pm 3	100 \pm 2	99 \pm 3	103 \pm 3	102 \pm 2	99 \pm 3				
	250	99 \pm 3	97 \pm 2	102 \pm 3	99 \pm 2	102 \pm 2	100 \pm 3				
	500	100 \pm 2	101 \pm 3	99 \pm 2	96 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 3				
^d Silica	100	80 \pm 1	87 \pm 2	91 \pm 2	74 \pm 1	83 \pm 2	87 \pm 2				
	250	27 \pm 1	30 \pm 1	40 \pm 1	24 \pm 1	31 \pm 1	52 \pm 2				
	500	16 \pm 1	18 \pm 1	30 \pm 1	14 \pm 1	16 \pm 1	27 \pm 1				

^a For meaning of acronyms see section 2.1

^b 0.5 g ^c 0.2 g ^d 0.1 g

Analyte concentration: ^e 500 mg L⁻¹; ^f 100 mg L⁻¹; ^g 20 mg L⁻¹; ^h Non detected

Table 5 shows representative results for the target analytes from breakthrough studies involving MSU-1 and silica according to the procedure specified in section 2.4. Because only ionic interactions were the driving force for the retention of the herbicides DQ and PQ on both MSU-1 and silica, these sorbents behaved similarly at the highest amount of material tested (0.5 g). Recoveries significantly decreased in silica compared to MSU-1 as lower amounts of sorbent were used (e.g. 0.2 g), probably because of the smaller surface area of the

former. Breakthrough volumes were around 50 mL. The MSU-1-based SPE of LAS, although not quantitative (see Table 5), showed a high breakthrough volume (e.g. 500 mL), which is of interest for environmental applications.

Cationic surfactants, which were expected to form cylindrical micelles on the pores of MSU-1 through ionic interactions with silanols and strong lateral dispersion forces between hydrocarbon chains, adsorbed strongly on the sorbent. High breakthrough volumes (e.g. 500 mL) were observed for amounts of sorbent so low as 0.1 g. Silica, although a good sorbent for cationic surfactants through the formation of hemimicelles, was clearly inferior to MSU-1 because of the absence of template effects. Recoveries in silica depended on the length of the alkyl chain since the formation of hemimicelles is favoured as the number of carbon atoms increases.

Methanol was more effective than acetonitrile for elution of solutions, the volume required ranging between 0.5 and 2 mL according to the amount of sorbent used (0.1 or 0.5 g). DQ and PQ were better eluted with heptafluorobutyric acid 0.1 M in methanol.

The results obtained for surfactants indicate that MSU materials are especially good sorbents for amphiphilic compounds. The internal surface can be conveniently tuned by modifying the pH to give negatively or positively charged groups or acceptor/donor groups that strongly interact with the polar groups of amphiphiles. On the other hand, the hexagonal pores place the amphiphilic molecules in the right position to establish strong dispersion interactions between the hydrocarbon chains. Because of the high number of amphiphilic molecules of interest in different areas (e.g. environmental, biological, agro-food, etc), the scope of application of MSUs as sorbents is expected to be broad.

3.2. Formation and SPE potential of cylindrical micelles on MSU-1

The hydrophilic surface of the mesoporous material can be easily transformed into hydrophobic to the required extent by adsorption of surfactants. In this way, MSU-1 can offer mixed mode mechanisms for solute retention (e.g. ionic or hydrogen bonding on the surface and dispersion or π - π interactions in the hydrocarbon chains), which is of potential interest for multiresidue determination. Physical adsorption of surfactants on MSU-1 was expected to produce rod-shape

micelles into the hexagonal mesoporous structure. The experimental isotherms for both DTAB and $C_{12}(EO)_{10}$ on MSU-1, presented on a double logarithmic scale (Figures 4A and B, respectively), were quite similar and different from conventional mineral oxides, where four regions corresponding to the successive formation of hemimicelles and admicelles are typically observed as the concentration of surfactant increases⁽²²⁾. Only two regions were observed for MSU-1 (Fig. 4); the first one, linear, corresponded to the filling of the pores with cylindrical micelles, the second one coincided with sorbent surface saturation. The boundary of these regions was determined by the critical micelle concentration (CMC) of the surfactants in aqueous solution (viz. 4208 and 33 mg L^{-1} for DTAB and $C_{12}(EO)_{10}$, respectively⁽²³⁾). Above the CMC, micellization strongly competed with adsorption and the coverage density remained nearly constant with increasing surfactant concentration in solution. Since solutes will undoubtedly partition between aqueous micelles and the functionalized MSU-1, the second region is unsuitable for SPE.

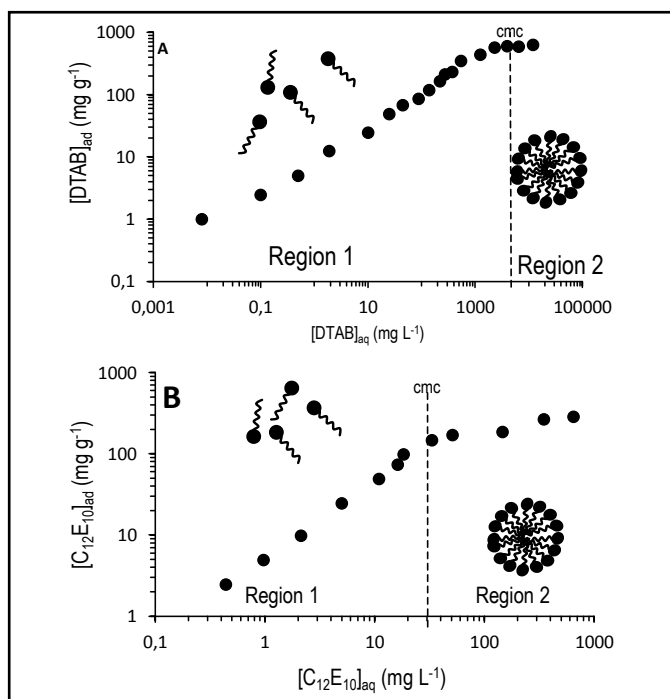


Figure 4. Isotherms for the adsorption of (A) dodecyltrimethyl ammonium bromide, DTAB, and (B) polyoxyethylene 10 lauryl ether, $C_{12}(EO)_{10}$, onto MSU-1 (0.5 g). See section 2.5 for experimental conditions

[22] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799

[23] M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley and Sons, New York, 1978, Chapter 3

The potential of using cylindrical micelles of DTAB on MSU-1 as a sorbent for SPE was investigated by extracting separately the six groups of compounds selected in our study (Table 1). The amount of MSU-1 used was 0.5 g for phenols, herbicides and anionic surfactants and 0.1 g for cationic and non-ionic surfactants. Loading of CTAB on MSU-1 was performed according the procedure specified in section 2.5. The amount of CTAB added to the solution (250 and 50 mg for 0.5 and 0.1 g of MSU-1, respectively) gave sorbents of 437 mg CTAB/g MSU-1 in equilibrium with monomeric surfactant, according to the corresponding adsorption isotherm (Fig. 4A). The solution containing the sorbent was filtered through 6-mL plastic-cartridges and then the solutions containing the analytes were percolated through the cartridges.

Table 6: Recoveries and standard deviations ($n=3$) for the SPE of the target compounds^a on DTAB cylindrical micelles/MSU1

Sorbent amount (g)	Sample volume (mL)	Recovery \pm standard deviation (%)				
		Phenol	4-CP	2,4-DCP	2,4,6-TCP	
0.5	100	76 \pm 3	100 \pm 1	98 \pm 2	104 \pm 3	
		DQ	PQ			
0.5	100	19 \pm 2	20 \pm 1			
		CT	IP	CX		
0.5	100	99 \pm 3	101 \pm 2	97 \pm 2		
		C₁₀(EO)₃	C₁₂(EO)₁₀	C₁₄(EO)₄		
0.1	100	99 \pm 2	104 \pm 1	99 \pm 1		
		BDDAB	BTDAB	BHDAC	TTAB	HTAB
0.1	500	101 \pm 3	99 \pm 2	100 \pm 2	102 \pm 1	101 \pm 2
		C₈-LAS	C₁₀₋₁₃-LAS			
0.5	500	99 \pm 3	101 \pm 2			

^a For meaning of acronyms see section 2.1

Table 6 shows the results obtained. The SPE of phenols, phenyl urea herbicides and anionic surfactants considerably improved compared with the use of

naked MSU-1 (see Tables 4 and 5). The SPE became quantitative for all these compounds and it was above 70% (as recommended for quantitation of environmental pollutants) for phenol. Retention of anionic surfactants on DTAB/MSU-1 was highly favored by the formation of LAS-DTAB mixed aggregates, that permitting their quantitative SPE at neutral pHs. As expected, the absence of silanol groups on the surface of DTAB/MSU-1 hindered the retention of quaternary ammonium herbicides (Table 6) so, as ionic interactions are required in SPE, MSU-1 should be only partially covered by DTAB.

3.3. MSU-1-based extraction of benzalkonium surfactants from environmental waters

The ability of MSU-1 to work under real conditions was assessed by applying it to the extraction of BAS (C_{12} , C_{14} , C_{16}) from water samples with different loads of organic matter (i.e. river and effluent and raw sewage). These compounds are widely used in cleaning and disinfection products at homologue concentrations in the sequence $C_{12} > C_{14} > C_{16}$ (e.g. 60/36/4). Their fate in the environment is of concern since there is a lack of data on their degradation⁽²⁴⁾ and they are known to be toxic even at low concentrations⁽²⁵⁾. Preconcentration of BAS prior to chromatographic analysis is mandatory due to the low levels found in aqueous samples (a few $\mu\text{g L}^{-1}$)^(26,27).

Extraction and determination of BAS was carried out according to the procedure specified in section 2.6. Calibrations curves were run for each homologue using standards in methanol and N-dodecylpyridinium as internal standard to remove the between-day fluctuations in the sensitivity of the detector. The slopes and intercepts for C_{12} , C_{14} and C_{16} homologues were 0.235 ± 0.008 , 0.349 ± 0.009 and 0.387 ± 0.006 and 0.05 ± 0.08 , 0.06 ± 0.05 and 0.09 ± 0.08 , respectively. The instrumental detection limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3 (the ratio between the peak areas for each BAS homologue and internal standard and peak area of noise). They were estimated to be ~ 0.04 ng. From this value and considering the maximal volume of sample used for analysis and the volumes elution and extract injected (section 2.6), as well as the recovery obtained from spiked samples ($\sim 100\%$), the detection limits of BAS in rivers and

[24] J.S. Mattew, N. Malcolm, *J. Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 235

[25] J.S. Leal, J.J. Gonzalez, K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, F. Comelles, M.T. Garcia, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 22 (1994) 13

[26] I. Ferrer, E.T. Furlong, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2583

[27] J. Norberg, E. Thordarson, I. Mathiasson, J.A. Jonsson, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 523

sewage effluents and influents were estimated to be ~1.6, 4 and 8 ng L⁻¹, respectively.

The possible interference of matrix components that could elute with BAS causing suppression or space-charge effects on the ion trap was assessed by comparison of the calibration curves obtained from standards and those obtained from influent and effluent wastewater and river water samples, fortified with known amounts of the target compounds. The analyte characteristics of both types of calibrations were similar so external calibration is recommended for the determination of BAS in sewage/river waters. However, it is advisable to check for matrix effects when the composition of samples is expected to be very different from those analyzed here.

Table 7: Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) and recoveries (%), along with the corresponding standard deviations^a, of BAS in wastewaters and river samples.

Sample location	BDDAB	BTDAB	BHDAC
Raw sewage ^b			
Mengibar	9.1±0.6	4.1±0.3	0.47±0.08
	101±5	98±6	99±4
Bailén	24±2	12±1	2.3±0.2
	95±3	94±5	99±4
Sewage effluent ^c			
Mengibar	0.49±0.05	0.36±0.03	<LOD
	95±6	94±3	96±4
Bailén	1.9±0.1	0.38±0.02	<LOD
	98±6	99±6	101±5
River water ^d			
Guadalquivir	0.12±0.01	<LOD	<LOD
	97±4	93±5	95±2

^a n=3; spiked samples: ^b10 $\mu\text{g L}^{-1}$, ^c5 $\mu\text{g L}^{-1}$, ^d1 $\mu\text{g L}^{-1}$
 LOD: lower than the detection limit

Table 7 lists the concentrations found for the target compounds, expressed as the mean value (n=3) and the corresponding standard deviation. These concentrations were in the range found by different authors in this type of environmental samples^(22,26) and the distribution of homologues was in agreement with the composition of commercial formulations. Total method recoveries were assessed by analyzing spiked samples, and the results obtained are also included in Table 7. Recoveries between 93 and 101% were found for all the samples analyzed.

The highest BAS concentrations were found in the Bailen sewage treatment plant, which receives both industrial and domestic wastewater. High percentages of BAS homologue removal was observed in the final effluents probably due to both their adsorption on sewage sludge⁽²⁸⁾ and biodegradation. The presence of BAS homologues in the samples was confirmed by MS/MS.

4. Conclusions

Mesoporous materials have been extensively used in different areas but scarcely applied in sample preparation for chemical analysis. In this work, it has been proved that MSU materials offer excellent retention properties for a variety of organic compounds that are common environmental pollutants. Besides high surface area, different types of interactions and modifiable surface through self-assembly processes, they offer unique properties for retention of amphiphiles in the hexagonal mesoporous channels by the formation of cylindrical micelles. These characteristics render MSU sorbents excellent candidates for multiresidue extractions.

The suitability of MSU sorbents for working under real world was proved by determining benzalkonium surfactants in polluted and natural environmental waters using sorbent amounts as low as 0.1 g for treating sample volumes between 250 and 1250 mL. These results make these materials very promising for the extraction of many emerging contaminants with amphiphilic properties (e.g. perfluoro alkyl substances, drugs, some pesticides, etc.)

[28] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151). FEDER also provided additional funding. F.J. López-Jiménez acknowledges to the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (AP2003-2840).

PARTE II

EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES

1. INTRODUCCIÓN

En esta parte de la Memoria se presenta el empleo de diferentes tipos de disolventes supramoleculares para la extracción de contaminantes de muestras sólidas o líquidas, usando distintos formatos como son la extracción heterogénea en dos (sólido-líquido) o en tres fases (sólido-líquido-líquido) y la extracción homogénea (líquido-líquido). Con este fin se emplean la coacervación in-situ, la extracción directa o la microextracción en una gota.

1.1. Aplicaciones analíticas de los disolventes supramoleculares

Las aplicaciones de los coacervados en procesos de extracción analítica han estado restringidas durante muchos años a la extracción de sustancias hidrófobas en muestras acuosas ambientales utilizando tensioactivos no iónicos. Esta metodología, denominada punto de nube (cloud-point extraction), presenta algunos inconvenientes asociados al tipo de tensioactivos empleados (ej. tritón X-100; la serie PONPE, éteres polietilenglicolmono-4-nonilfenol; etc) tales como la elevada temperatura necesaria para que se produzca el fenómeno y la elevada absorción en la región ultravioleta.

A pesar de estos inconvenientes, los coacervados constituidos por micelas acuosas de tensioactivos no iónicos se han usado para la extracción de una gran variedad de compuestos⁽¹⁾ tales como proteínas;^(2,3) iones metálicos, previa

[1] Ballesteros-Gómez, A.; Sicilia, M.D.; Rubio S. *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108

[2] Bouvier, T.; Etges, R.J.; Bordier, C.J. *J. Biol. Chem.* 260 (1985)15504

formación de complejos neutros,⁽⁴⁾ y compuestos orgánicos apolares tales como PAHs,⁽⁵⁾ PCBs;⁽⁶⁾ ácidos húmicos y fúlvicos;⁽⁷⁾ plaguicidas;⁽⁸⁾ etc .

La descripción de coacervados constituidos por micelas acuosas de tensioactivos catiónicos⁽⁹⁾ y aniónicos⁽¹⁰⁾ eliminó algunos de los inconvenientes asociados al uso de tensioactivos no iónicos. Así, fue posible la extracción de compuestos en un mayor intervalo de polaridad mediante su solubilización en los grupos polares de las micelas a través de diferentes interacciones (electrostáticas, π -catión, formación de agregados mixtos, etc.). Basada en la coacervación de tensioactivos catiónicos se ha propuesto la extracción/concentración de clorofenoles.⁽⁹⁾ En este caso las eficiencias de extracción son muy elevadas ya que además de interacciones hidrófobas entre los analitos y las micelas se producen interacciones π -catión entre el anillo aromático de los clorofenoles y el grupo amonio del tensioactivo. El inconveniente de estos coacervados es la elevada concentración de electrolito necesaria para que se produzca la coacervación (400 g L⁻¹ de NaCl), lo que ha restringido su uso.

La coacervación de micelas acuosas de tensioactivos aniónicos, inducida por ácido, fue propuesta por nuestro grupo de investigación con objeto de evitar la coelución de los analitos polares y los tensioactivos en el sistema cromatográfico.⁽¹¹⁾ La ausencia de anillos aromáticos en la estructura de los tensioactivos y su gran polaridad ha permitido la aplicación de estos coacervados a la extracción de un gran número de contaminantes y posterior determinación de los mismos mediante cromatografía líquida combinada con detección UV, fluorescente y espectrometría de masas. Las condiciones ácidas drásticas en las que se producen, alrededor de 3 M, han sido de gran utilidad para el tratamiento de muestras sólidas, aplicaciones en los que estos coacervados han encontrado especial relevancia.

Entre las aplicaciones desarrolladas destacan la extracción de PAHs en suelos, lodos y sedimentos⁽¹⁰⁾ y sobre todo la extracción de sustancias anfífilicas

[3] Saitoh, T.; Hinze, W.L. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520

[4] Chen, J.; Teo, K.C. *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 325

[5] Ferrer, R.; Beltrán, J.L.; Guiteras, J. *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 199

[6] Eiguren-Fernández, A.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. *Quim. Anal.* 16 (1997) 283

[7] Revia, R.L.; Makharadze, G.A. *Talanta* 48 (1999) 409

[8] García-Pinto, C.; Pérez-Pavón, J.L.; Moreno-Cordero, B. *Anal. Chem.* 67 (1995) 2696

[9] Jin, X.; Zhu, M.; Conte, E.D. *Anal. Chem.* 71 (1999) 514

[10] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 1

[11] Casero, I.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519

tales como tensioactivos aniónicos (alquilbenceno sulfonatos),^[12] catiónicos (alquilamonio)^[13] y no iónicos (alquilfenol polietoxilados y alcohol etoxilados)^[14] en lodos. La formación de agregados mixtos entre los tensioactivos analitos y el tensioactivo aniónico que constituye el coacervado ha permitido la extracción de los mismos con elevada eficiencia y factores de preconcentración entre 50 y 100.

En los últimos años, una de las líneas prioritarias de investigación en nuestro grupo ha sido el desarrollo de nuevos coacervados que permitan el establecimiento de diferentes interacciones con los analitos, alcancen elevados factores de preconcentración y se produzcan en condiciones experimentales suaves. En este contexto destacan los coacervados constituidos por micelas inversas^[15] y vesículas^[16] de ácidos alquilcarboxílicos y alcoholes^[17], inducidos por agua y tetrabutilamonio, respectivamente. Además de las interacciones que permiten establecer (hidrófobas, puentes de hidrógeno, iónicas y π -catión), un aspecto clave de estos coacervados es la elevada concentración de tensioactivo que contienen (entre 0.7 y 1 mg μL^{-1}) lo que permite alcanzar elevados rendimientos utilizando pequeños volúmenes de los mismos. Como consecuencia, se alcanzan factores de preconcentración entre 100 y 400. Por otro lado, los coacervados de micelas inversas constituidos por ácidos carboxílicos se producen a pH inferiores a 4 y los de vesículas en el intervalo de pH entre 5 y 10, abarcando un amplio intervalo en el que se puede seleccionar el valor más apropiado para la extracción, dependiendo de las características de los analitos.

En la Tabla 1 se comparan las recuperaciones obtenidas empleando coacervados de vesículas y micelas inversas para diferentes analitos, clasificados respecto al tipo de interacción predominante que se produce con el tensioactivo que forma el coacervado. Como puede observarse, prácticamente en todos los casos se obtienen recuperaciones cuantitativas a excepción de la extracción de alquilbenceno sulfonatos y difenzoquat cuando se utilizan coacervados de micelas inversas y vesículas, respectivamente.

[12] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 109

[13] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143

[14] Cantero, M.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 147

[15] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473

[16] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 72 (2006) 7229

[17] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S. *Anal. Chem.* 84 (2012) 342

Tabla 1. Recuperaciones, expresadas en porcentajes, obtenidas en la extracción coacervativa de diferentes compuestos orgánicos usando coacervados de vesículas de ácido decanoico (C10) y micelas inversas de ácido octanoico (C8)

Tipo de interacción	Analito	[Analito] (M)	Recuperaciones (%)	
			Vesículas	Micelas inversas
Hidrófoba	Naftaleno	3.9×10^{-5}	99	95
	Antraceno	2.8×10^{-5}	101	98
	Benzo(a)pireno	2.0×10^{-5}	100	97
Formación de agregados mixtos	Tritón X-100	8.3×10^{-6}	99	98
	Alquilbenceno sulfonatos	2.9×10^{-5}	100	5
Enlaces de hidrógeno	4-clorofenol	3.9×10^{-5}	95	97
	2,4-diclorofenol	3.2×10^{-5}	100	99
	2,4,6-triclorofenol	2.6×10^{-5}	98	101
	Pentaclorofenol	1.9×10^{-5}	100	101
	Bisfenol A	3.8×10^{-5}	99	95
	Bisfenol F	3.6×10^{-5}	100	97
	Bencilbutilftalato	5.1×10^{-5}	80	99
	Dibutilftalato	4.8×10^{-5}	85	100
	Paratión	4.1×10^{-5}	90	96
	Atracina	-	98	95
	Hidroquinona sulfonada	5.2×10^{-5}	-	95
Iónica	Hidroquinona sulfonada	5.2×10^{-5}	95	-
	Azul brillante de coomassie	7.3×10^{-7}	100	-
	Difenzoquat	6.9×10^{-6}	50	-

Hasta la fecha, estos coacervados se han aplicado a la extracción de bisfenoles A y F y los correspondientes diglicidil ésteres en aguas residuales⁽¹⁸⁾, a la extracción de contaminantes en alimentos líquidos⁽¹⁹⁾, PAHs en aguas⁽²⁰⁾, ocratoxina A en vinos⁽²¹⁾ y trigo ⁽²²⁾, bisfenol A en alimentos enlatados⁽²³⁾ y orina⁽²⁴⁾, medicinas veterinarias en peces y mariscos ⁽²⁵⁾ y sulfonamida en carne ⁽²⁶⁾.

1.2. Sudanes

Los colorantes Sudán son compuestos con grupos azo en su estructura empleados habitualmente en gran cantidad de procesos industriales para dar color a sustancias tales como combustibles, plásticos, ceras, productos de limpieza de zapatos y suelos, tintas de impresora y textiles. Algunos de los más empleados son los Sudán I, II, III y IV, cuya estructura puede verse en la Figura 1.

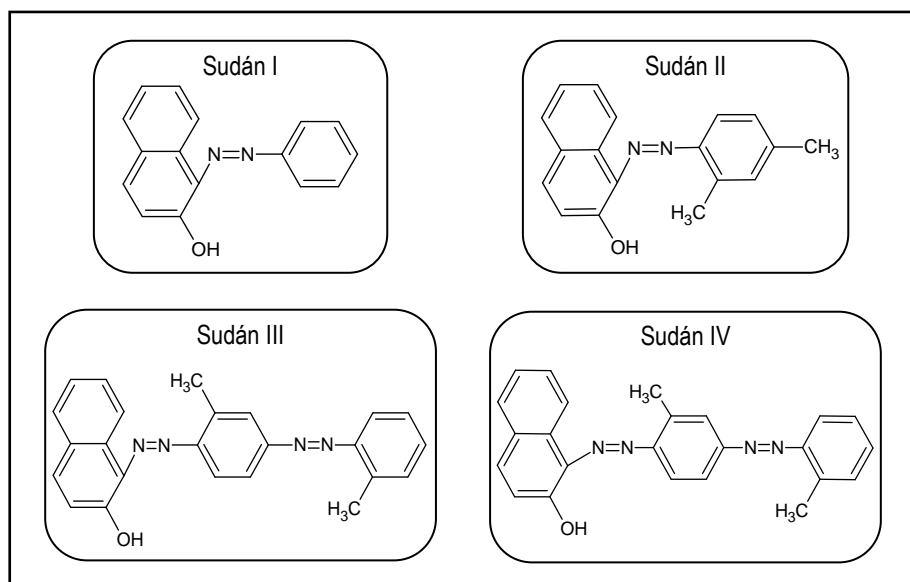


Figura 1: Estructura de los colorantes Sudán estudiados

- [18] Ballesteros-Gómez, A.; Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51
 [19] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530
 [20] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168
 [21] García-Fonseca, S.; Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 3
 [22] García-Fonseca, S.; Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2376
 [23] García-Prieto, A.; Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51
 [24] García-Prieto, A.; Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 19
 [25] Costi, E.; Sicilia, M.D.; Rubio, S. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1447
 [26] Costi, E.; Sicilia, M.D.; Rubio, S. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6520

Recientemente, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer estableció que estas sustancias podían ser responsables de carcinogénesis, clasificándolas en su categoría 3,⁽²⁷⁾ por lo que las autoridades responsables europeas prohibieron su presencia en alimentos. Sin embargo, la detección en la frontera europea de Sudán I en alimentos procedentes de terceros países, causó la alerta del Sistema de Alerta Rápida de Alimentos y Alimentación (RASFF) decretando el análisis en aduana de los alimentos sospechosos, principalmente los que contienen chile picante, a los que se le añaden estos colorantes para darles un color rojo o anaranjado que los hace más atractivos a los consumidores. La detección de estos compuestos en cualquier alimento que se encuentre en suelo europeo conlleva automáticamente su destrucción.

Sin embargo, cabe destacar que la legislación española permite la presencia del colorante Sudán I como subproducto de otro colorante, el sunset yellow.

1.3. Sustancias estrogénicas

La presencia en el medioambiente de sustancias con actividad estrogénica tiene consecuencias graves en la dinámica de los ecosistemas acuáticos a causa de la disfunción hormonal que provocan en el organismo de los animales. Las sustancias que pueden causar alteraciones del sistema endocrino se clasifican en tres tipos fundamentales:⁽²⁸⁾

- Hormonas naturales: son producidas y se encuentran de forma natural en el organismo de los seres humanos y de los animales (progesterona, testosterona, estradiol, estriol y estrona), o los fitoestrógenos que se presentan en algunas plantas y presentan actividad estrogénica al ser ingeridos.
- Sustancias artificiales: incluyen dos categorías
 - Hormonas sintéticas: son sustancias muy similares o idénticas a las hormonas naturales y se emplean en contraceptivos y terapias de

[27] International Agency for Research on Cancer (1975). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 8.

[28] Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas, 1999. COM(1999)706 final

sustitución hormonal. Han sido concebidas como alteradores/reguladores del sistema endocrino.

- Sustancias químicas artificiales: concebidas inicialmente para su uso industrial, una vez en el organismo mimetizan el efecto de las hormonas naturales alterando el funcionamiento del sistema endocrino. También se incluyen algunos subproductos industriales que causan el mismo efecto como, por ejemplo, las dioxinas.

1.4. PAHs

El análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos ha sido ampliamente abordado ya que es muy conocido su efecto nocivo sobre la salud humana como carcinógenos.⁽²⁹⁾ Su formación a causa de la combustión incompleta de la materia orgánica los ha convertido en sustancias ubicuas que principalmente proceden de fuentes como la industria o motores de combustión. Los PAHs se introducen en el cuerpo humano a través de dos vías: el humo del tabaco, aunque esta vía afecta fundamentalmente a los fumadores, y la alimentación que afecta a toda la población.

Los PAHs llegan a los alimentos de diferentes formas: los de origen animal se contaminan a través de la alimentación del animal del que proceden, mientras que los de origen vegetal son absorbidos del suelo por las raíces o bien son captados del aire por la cera que recubre las hojas. Pero también, el modo de preparación de esos alimentos puede enriquecer su contenido en PAHs cuando se asan, se tuestan o se ahúman.

Hasta la fecha, la U.E. solo limita la cantidad de benzo[a]pireno (BaP) en alimentos pues considera que este compuesto es un buen indicador del contenido total de PAHs. Sin embargo la EFSA ha llevado a cabo estudios sobre el contenido real de PAHs en alimentos para estudiar la capacidad de predicción del BaP. El estudio se llevó a cabo considerando inicialmente un grupo de 16 PAHs, para finalmente ir reduciendo la cantidad de compuestos a listas de 8, 4 y 2 (Tabla 2) para compararlas con la predicción ofrecida por el BaP solo. La conclusión final de la EFSA fue que se recomienda determinar los hidrocarburos contenidos en las listas

[29] IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 92. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon: International Agency for Research on Cancer (in press).

PAH8 o PAH4, sin que se observe una mejora notable en la predicción del efecto de PAHs usando PAH8 frente a PAH4.

Tabla 2. Listas europeas de referencia de contenido en PAHs en alimentos

BaP	Actual				
CHR		PAH2			
BaA, BbF			PAH4		
BkF, BghiP, DBahA, IP				PAH8	
BjF, cPP, DBaeP, DBahP, DBaiP, DBalP, MCH, BcFl					PAH 15+1
BaP: benzo[a]pireno; CHR: criseno; BaA: benzo[a]antraceno; BbF: benzo[b]fluoranteno BkF: benzo[k]fluoranteno; BghiP: benzo[g,h,i]pireleno; DBahA: dibenzo[a,h]antraceno; IP: indeno[1,2,3-c,d]pireno; BjF: benzo[j]fluoranteno; cPP: ciclopentapireno; DBaeP: dibenzo[a,e]pireno; DBahP: dibenzo[a,h]pireno; DBaiP: dibenzo[a,i]pireno; DBalP: dibenzo[a,l]pireno; MCH: metilcriseno; BcFl: benzo[c]fluoreno.					

1.5. Clorofenoles

Los clorofenoles se usan como biocidas, destacando el pentaclorofenol que tiene múltiples usos: fungicida en maderas y tejidos industriales, bactericida en el curtido de pieles y en la industria de la pasta de papel, moluscida en tratamiento de aguas industriales (aguas de refrigeración) y como agente de esterilización.

Los clorofenoles son sustancias reconocidas por la IARC como cancerígenas desde el año 1987 además de peligrosas por toxicidad por inhalación, por contacto en piel y ojos y para el medioambiente, por lo que su uso ha sido ampliamente regulado por la Unión Europea.⁽³⁰⁾ Así, atendiendo a criterios de toxicidad, persistencia y bioacumulación se reguló prioritariamente el posible vertido de estos compuestos al medio acuático.⁽³¹⁾ Además, se han fijado valores límite de pentaclorofenol en residuos peligrosos, con el fin de eliminar la contaminación del mismo en medios acuáticos.⁽³²⁾

[30] IARC monographs (supplement 7) Chlorophenols, p. 154.1987

[31] Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.

[32] Directiva 86/280/CEE del Consejo, de 12 de junio de 1986, relativa a los valores límite y los objetivos de calidad para los residuos de determinadas sustancias peligrosas comprendidas en la lista I del Anexo de la Directiva 76/464/CEE.

PARTE II

CAPÍTULO 3

**Supramolecular solvent-based
microextraction of Sudan dyes in
chilli-containing foodstuffs prior to
their liquid chromatography-
photodiode array determination**

Supramolecular solvent-based microextraction of Sudan dyes in chilli-containing foodstuffs prior to their liquid chromatography-photodiode array determination

Food Chemistry 121 (2010) 763-769

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

Abstract

A supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid was proposed for the simple and rapid extraction of Sudan I, II, III and IV from chilli-containing foodstuffs. The procedure involved the extraction of minute quantities (0.5-1 g) of homogenised food sample with an aqueous solution containing 10% THF and 200 mg of decanoic acid, conditions under which the supramolecular solvent (around 330 μL) formed in situ and instantaneously. The overall sample treatment took about 30 min and several samples could be simultaneously treated using conventional lab equipment. No clean-up or solvent evaporation were required before determination of Sudan dyes by liquid chromatography and photometric detection. Extractions were independent of salt addition (up to 1 M), the temperature (up to 60°C) and the pH (below 4) rendering the method robust. The detection limits of the method were 4.2, 2.7, 6.5 and 7.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for Sudan I, II, III and IV, respectively. Recoveries obtained by applying this approach to the analysis of six chilli-containing sauces fortified with Sudan dyes at the $\mu\text{g kg}^{-1}$ level were in the interval 86-108% with relative standard deviations between 2% and 7%.

1. Introduction

Sudans are a group of azo dyes widely used as additives in fuels, plastics, waxes, shoe and floor polishes, printing inks and the textile industry. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified Sudan dyes as category 3 carcinogens,⁽¹⁾ so their use as additives in food products for human consumption is banned worldwide, except in some African and Asian countries. According to the data collected through the RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed, European Regulation 2002/178/EC), there were 390 notifications in the period 2003-2004 about the fraudulent use of dyes in food, mainly involving chilli or curry powder contaminated with either Sudan I or IV or a combination of both.⁽²⁾ Most cases identified India as the country of origin of the adulterated products, followed by Turkey. To solve this problem, the European Commission adopted emergency measures regarding the chilli and chilli products (European Commission Decision 2005/402/EC). This regulation prohibits the import of this type of foods unless an original analytical report accompanying the consignment demonstrates that they do not contain Sudan I-IV. Likewise, Member States should take appropriate measurements in order to verify the absence of Sudan dyes. The consequence of this control has been a sharp decrease in the number of notifications about the fraudulent use of dyes in food (213 notifications in 2005, 60 in 2006 and 47 in 2007⁽²⁻³⁾). In order to keep this pressure on the market, a number of analyses have to be made and, therefore, the development of rapid, simple, low cost and reliable analytical methods is highly valuable.

Several methods have been reported in the literature to quantify Sudan dyes in foods. Liquid chromatography combined with photometry⁽⁴⁻⁷⁾ and mass spectrometry⁽⁸⁻¹²⁾ are by far the preferred techniques, although others such as liquid

[1] International Agency for Research on Cancer (1975). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 8.

[2] Rapid Alert System for food and feed (RASFF) (2006). Annual Report 2006. ISSN:1830-7302. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm

[3] Rapid Alert System for food and feed (RASFF) (2007). Annual Report 2007. ISSN:1830-7302. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm

[4] Cornet, V.; Govaert, Y.; Moens, G.; Van Loco, J.; Degroodt, J.M. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006), 639.

[5] Ertas, E.; Özer, H.; Alasalvar, C. *Food Chem.* 105 (2007) 756.

[6] Mazzetti, M.; Fascioli, R.; Mazzoncini, I.; Spinelli, G.; Morelli, I.; Bertoli, A. *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 935

[7] Puoci, F.; Garreffa, C.; Iemma, F.; Muzzalupo, R.; Spizzirri, U. G.; Picci, N. *Food Chem.* 93 (2005) 349.

[8] Calbiani, F.; Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A.; Pistarà, L.; Zagnoni, I. *J. Chromatogr. A*, 1042 (2004) 123.

[9] Calbiani, F.; Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A.; Zagnoni, I. *J. Chromatogr. A* 1058 (2004), 127.

[10] Ferrer, C.; Fernández-Alba, A.R.; Ferrer, I. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87 (2007) 999.

[11] He, L.; Su, Y.; Fang, B.; Shen, X.; Zeng, Z.; Liu, Y. *Anal. Chim. Acta* (2007). 594 139.

[12] Ma, M.; Luo, X.; Chen, B.; Su, S.; Yao, S. *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 170.

chromatography–chemiluminescence⁽¹³⁾ or micellar electrokinetic capillary chromatography⁽¹⁴⁾ have also been proposed. As a rule, different steps (i.e. extraction, clean-up and/or solvent evaporation) are required to reach adequate sensitivity and selectivity.

A variety of solvents has been used for the extraction of Sudans including dimethylsulphoxide,⁽¹²⁾ acetone,^(8,9) acetonitrile,^(4,10) ethanol⁽¹³⁾ and chloroform.⁽⁷⁾ The use of solvent mixtures is also frequent.^(5,11) The volume of organic solvent consumed per sample extraction is relatively high (≈ 50 mL) and, frequently, further clean-up is carried out. Solid-phase extraction (SPE) with sorbents such as alumina,⁽¹¹⁾ molecularly imprinted polymers⁽⁷⁾ etc., have been used for this purpose. In all cases, evaporation to dryness of 30–50 mL of the solvent used for extraction or SPE elution is required.^(5,11) As a result, sample treatment constitutes the bottleneck in Sudans quantitation and there is a need for simpler, environmentally-friendlier and lower-cost extraction/clean-up methods for the routine control of these banned additives in foodstuffs.

This paper explores for the first time the suitability of supramolecular solvents for the extraction of Sudans from chilli-containing products. Supramolecular solvents are water-immiscible liquids made up of supramolecular assemblies dispersed in a continuous phase.⁽¹⁵⁾ They are produced from amphiphile solutions by two well-defined self-assembly processes occurring on two scales, molecular and nano. First, amphiphilic molecules spontaneously form three-dimensional aggregates (e.g. aqueous and reversed micelles or vesicles) above a critical aggregation concentration. Then, the generated nanostructures self-assemble in larger aggregates with a wide size distribution in the nano and micro scale regimes by the action of an external stimulus (e.g. temperature, electrolyte, pH, solvent) and separate from the bulk solution by a mechanism that remains elusive. The phenomenon of liquid–liquid phase separation is named coacervation⁽¹⁶⁾ and the corresponding extraction approach has been named the cloud point technique in the analytical literature.⁽¹⁷⁾ For many years, supramolecular solvents were made up of

[13] Zhang, Y.; Zhang, Z.; Sun, Y. *J. Chromatogr. A* 1129 (2006) 34.

[14] Mejia, E.; Ding, Y.; Mora, M.F.; Garcia, C.D. *Food Chem.* 102 (2007) 1027.

[15] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168.

[16] Gander, B., Blanco-Prieto, M. J., Thomasin, C., Wandrey, D., & Hunkeler, D. (2002). Coacervation/phase separation. In J. Swarbrick & J. C. Boylan (Eds.). *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (Vol. 1, pp. 481–496). New York: Marcel Dekker.

[17] Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.

aqueous surfactant micelles and they were mainly applied to the extraction of contaminants from environmental water (17-22) soil and sediment(23) and sludge.(24-25) Our research group has recently introduced supramolecular solvents made up of vesicles(26) and reversed micelles(27) of alkyl carboxylic acids which have outstanding properties for extraction processes with regard to the variety of interactions they can establish with solutes and the high concentration of amphiphiles ($\approx 0.7\text{-}1\text{ mg }\mu\text{L}^{-1}$), and therefore of binding sites, they contain.

In this research, a supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid,(27-28) which has the capability to provide different type of interactions (e.g. hydrophobic and hydrogen bonding) with the dyes, is proposed for the extraction of Sudans from chilli-containing foodstuffs. This solvent is produced from environmentally friendly and inexpensive biosurfactants and the coacervation occurs rapidly at room temperature. Below, the main results obtained are presented and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Tetrahydrofuran (THF), HPLC-grade acetonitrile and hydrochloric acid were supplied by Panreac (Sevilla, Spain). Decanoic acid was purchased from Fluka (Madrid, Spain). A solution of decanoic acid (50 g L^{-1}) was prepared in THF. Sudan I (1-(phenylazo)-2-naphtol), Sudan II (1-(2,4-dimethylphenylazo)2-naphtol), Sudan III (1-(4-phenylazophenylazo)-2-naphtol) and Sudan IV (1-(20-methyl)-4-(20-methylphenylazo)phenylazo)-2-naphtol) were supplied by Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Stock standard solutions containing individual Sudan dyes at a concentration of 100 mg L^{-1} were prepared in acetonitrile and stored under dark at

[18] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Moreno-Cordero, B.; Pérez-Pavón, J.L.; García-Pinto, C.; Fernández-Laespada, E. *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.

[19] Casero, I.; Sicilia, D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.

[20] Jin, X.; Zhu, M.; Conte, E.D. *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.

[21] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1613.

[22] Saitoh, T.; Hinze, W.L. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.

[23] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 962(2002) 1

[24] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.

[25] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1030 (2003) 109.

[26] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 78 (2007) 7229.

[27] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

[28] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 269.

4°C. Working solutions containing 5 mg L⁻¹ of Sudan dyes were made by appropriate dilutions of the stock solutions with acetonitrile. Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain).

2.2. Apparatus

The liquid chromatographic system used (Breeze HPLC, Waters, Milford MA, USA) consisted of a 1525 binary pump, a 717plus automatic injector, a 1500 series column heater and a 2898 photodiode-array detector. The stationary-phase column was made up of octadecylsiloxane (5 µm particle size, 25 cm length, 4.6 mm of internal diameter) and was supplied by Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain). It was thermostated at 40 °C. A mechanical stirrer RW-14-Basic by Ika (Staufen, Germany) was used to homogenise the spiked samples. A magnetic stirrer, Basicmagnix from Ovan (Barcelona, Spain), and a digitally regulated centrifuge, Mixtasel from JP-Selecta (Abrera, Spain), were used for sample preparation. The volume of supramolecular solvent was measured with a digital caliper from Medid Precision, S.A. (Barcelona). Centrifuge tubes with narrow necks (as depicted in Figure 1a) were designed by authors in order to make easier the measurement and collection of the solvent after extraction. Pobel S.A. (Madrid, Spain, web page: www.pobel.com) constructed them from commercial heavy-duty glass cylindrical centrifuge tubes with round-bottom (catalog No. 159050). The measurements were as follows; bottom: 34 mm of outside diameter and 57 mm high, neck: 7 mm of internal diameter and 35 mm high. Their capacity was between 41 and 42 mL.

2.3. Determination of Sudan dyes in chilli-containing foodstuffs

2.3.1. Samples

Chilli-containing sauces (tomato, vinegar and meat sauce), two brands each, were purchased randomly in local supermarkets. The samples were blended with a kitchen food mixer (≈9000 rpm, Thermomix TM 21, Vorwerk, Germany) and stored at 4°C until used.

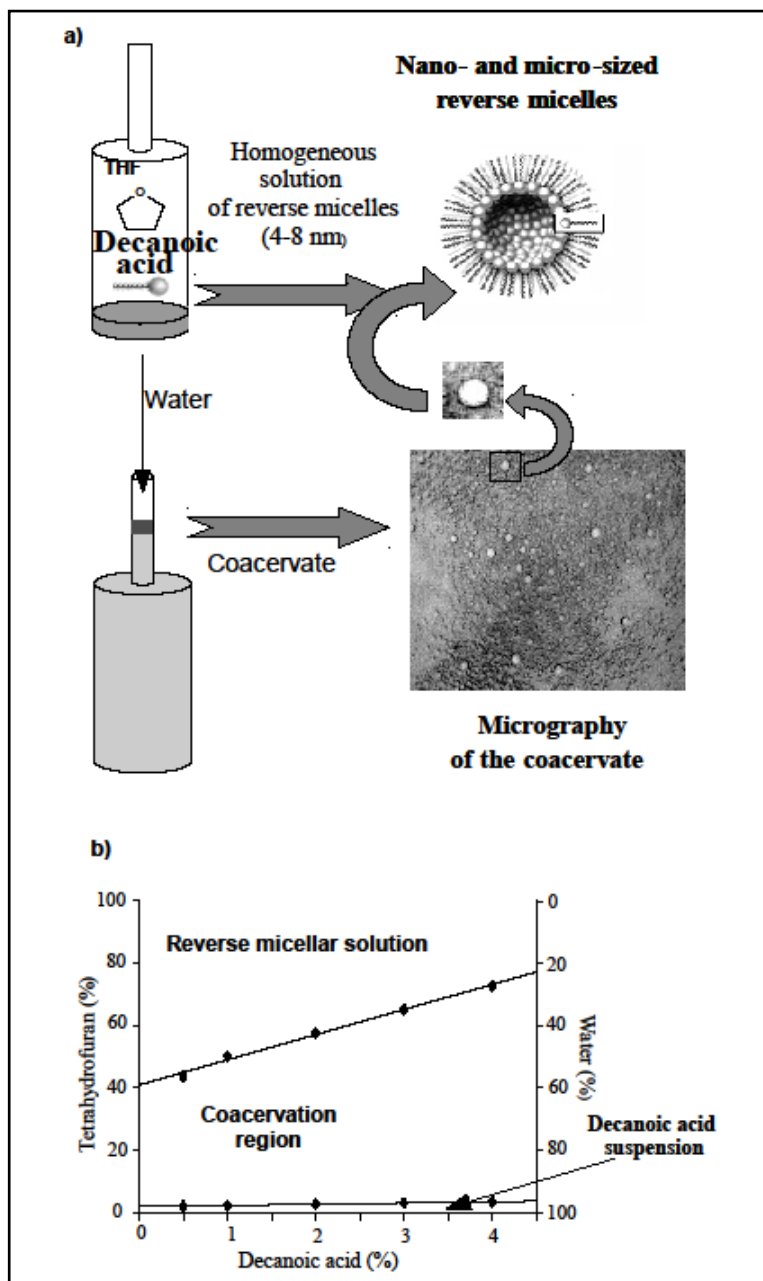


Figure 1. (a) Illustration of the two self-assembling processes involved in the formation of the supramolecular solvent. The micrograph displayed was made with light microscopy (bright field). (b) Phase diagram of decanoic acid in binary mixtures of THF:water. Final volume of the solution (THF + Water) = 40 mL. Experiments made at room temperature.

2.3.2. Supramolecular solvent-based microextraction

The sample (≈ 1 g) was weighted in a specially-designed centrifuge cone (Figure 1a) and then 4 mL of decanoic acid solution (50 g L^{-1}) in THF were added. The mixture was homogenised by magnetic stirring at 1200 rpm for one min. Next, 36 mL of distilled water at pH around 3, adjusted with hydrochloric acid, were added. Immediately, the supramolecular solvent spontaneously formed into the bulk solution. The mixture was stirred (10 min, 1200 rpm) to favour the extraction of Sudans and then centrifuged at 2500 rpm ($1050g$) for 15 min to accelerate the separation of the supramolecular solvent. Finally, the volume of solvent (around 330 μL), which was standing at the narrow neck of the centrifuge tube (Figure 1a), was calculated by measuring its height with a digital calliper. The major part of it was withdrawn with a microsyringe and transferred to a glass vial of the LC automatic injector.

2.3.3. Quantitation of Sudan I, II, III and IV

The mobile phase used for the chromatographic separation of Sudan dyes consisted of water and acetonitrile at a flow-rate of 1 mL min^{-1} . The elution program was as follows: isocratic (water:acetonitrile 30:70) for 10 min, linear gradient up to water:acetonitrile 10:90 in 60 min and then isocratic (water:acetonitrile 10:90) for five minutes. After the elution of the dyes, cleaning of the column with THF for 5 min was carried out in order to remove non-eluted matrix components. Then, the column was re-equilibrated with water and acetonitrile (30:70) for 20 min. Quantification of Sudan I, II, III and IV was carried out by measuring peak areas at 480, 495, 506 and 518 nm, respectively. Calibration was run by injecting 20 μL of standard solutions in acetonitrile containing between 2 and 200 ng of each dye.

3. Results and discussion

3.1. *Supramolecular solvent description*

Decanoic acid dissolves in THF forming reverse micelles (Figure 1a) according to a sequential-type self-association model with at least three critical aggregation concentrations (4.8 ± 0.2 , 7.6 ± 0.4 and $51 \pm 2 \text{ mM}$).⁽²⁸⁾ The addition of water to this binary system causes partial desolvation of the aggregates, which makes

their interaction easier and promotes the formation of larger reverse micelles that separate from the THF:water bulk solution as an immiscible liquid (Figure 1a). So, water is the agent that causes the coacervation. The resulting supramolecular solvent consists of reverse micelles with a wide size distribution in the nano and micro scale regimes, dispersed in a THF:water continuous phase. Figure 1a shows a micrograph of the supramolecular solvent and a picture of the aggregates making it up. As reverse micelles are produced from the protonated decanoic acid form ($pK_a 4.8 \pm 0.2$), pH values below 4 are required for the formation of the supramolecular solvent. Figure 1b shows the relative concentration of the three supramolecular solvent components at which the coacervation occurs and consequently the supramolecular solvent is produced. Beyond the boundaries of this region, the decanoic acid precipitates or solubilizes in the THF:water bulk solution. The reversed micelles in the supramolecular solvent provide a twofold mechanism for Sudan dyes solubilization, namely van der Waals interactions in the decanoic acid hydrocarbon chains and hydrogen bonds in the micellar core, so they are expected to be extracted efficiently with this solvent.

3.2. Optimisation of the supramolecular solvent-based microextraction

Optimisation was carried out by extracting aliquots of a blank tomato sauce spiked with Sudan I-IV at the level of 300 ng g⁻¹ each. Fortification was made by adding 250 μ L of a standard solution containing 30 mg L⁻¹ of Sudan I-IV to aliquots of 25 g of sample. Homogenisation was obtained by stirring the sample with a RW-14 Basic mechanical stirrer (Ika, Staufen, Germany) at 500 rpm for 5 min. The samples were always kept under darkness during this process by covering the vessel with aluminium foil. Once the samples were homogenised, they were stored at 4 °C until use. Recoveries for Sudan dyes were obtained by extracting the fortified sample (0.5 g) under a variety of experimental conditions (0.25-3% decanoic acid; 2-10% THF; temperature 20-60°C; pH 1-4; electrolyte 0-1 M; extraction time 0-20 min) according to the general procedure specified in the Section 2.3.2 and changing each variable in turn while keeping the other constants. Experiments were made in triplicate. Method quantitation limits (MQL) were used as a criterion for the selection of the optimal conditions for extraction. They were estimated from the volume of the supramolecular solvent (V) and the recoveries and instrumental quantification limits (IQL) for the dyes (IQL: 1.7, 2.6, 2.4 and 2.0 ng for Sudan I, II, III and IV, respectively, expressed as the absolute amount injected in the

chromatographic system). Conditions giving minimal method quantitation limits (MQL) were selected provided that the extraction for the dyes was above 70% and the relative standard deviation of the method was below 10%.⁽²⁹⁾

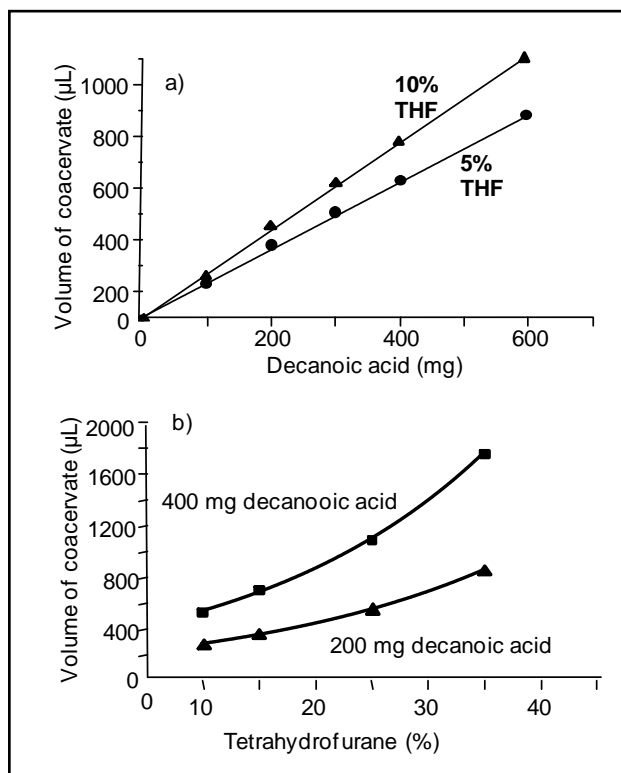


Figure 2. Volume of coacervate as a function of: (a) the amount of decanoic acid at two percentages of THF, and (b) the concentration of tetrahydrofuran at two amounts of decanoic acid.

3.2.1. Influence of the solvent amount and composition

The supramolecular solvent used in this study is mainly made up of decanoic acid and THF and a minimal proportion of water. Figure 2 shows the dependence of the volume of solvent obtained on both the amount of decanoic acid (a) and the percentage of THF (b). The volume increased linearly as the amount of decanoic acid did independently of the percentage of THF investigated. This type of dependence indicated that the composition of the solvent kept constant when the other variables remained unchanged. The corresponding equations for 5% and 10% of THF were $y = (29 \pm 28) + (1.27 \pm 0.08) x$ and $y = (14 \pm 14) + (1.62 \pm 0.02) x$,

[29] Green, J.M. *Anal.Chem.* 68 (1996) 305^a.

respectively, where y was the volume of the solvent in μL and x the amount of decanoic acid in mg. The correlation coefficients were 0.996 and 0.999. The slopes of the linear relationship were similar to that obtained in the absence of food sample,⁽³⁰⁾ so although matrix components could be incorporated to the solvent they did not influence its volume. The relationship between the volume of the supramolecular solvent and the percentage of THF was exponential (Figure 2b) and fit to the equation $y=b_0e^{bz}$, where y was the volume of the solvent in μL and z the percentage of THF. The corresponding equations for 200 and 400 mg of decanoic acid were $y = (223 \pm 11) e^{(0.045 \pm 0.003)z}$ and $y = (433 \pm 17) e^{(0.046 \pm 0.002)z}$ respectively, with correlation coefficients of 0.997 and 0.998. This type of dependence indicated that progressively more THF was incorporated to the solvent as the percentage of THF in the solution increased and consequently, the reverse micelles became more and more diluted. As these equations were also similar to those obtained in the absence of food sample, the general equation previously derived for the prediction of the volume of the solvent (y) obtained as a function of the amount of decanoic acid (x) and percentage of THF (z) was also applicable to tomato sauce samples.⁽³⁰⁾ So, it is possible to estimate the volume of solvent and therefore the maximum concentration factor that can be obtained under given experimental conditions through the equation $y = 1.06 x e^{(0.04731z)}$. Figure 3(a-d) shows the recoveries obtained and the MQLs calculated for Sudan dyes as a function of the percentage of THF and amount of decanoic acid used for extraction. The increase in the amount of THF hardly influenced the MQL values (Figure 3c) because both recoveries (Figure 3a) and solvent volume (Figure 2b) increased similarly. A THF concentration of ca. 10%, which permitted to obtain recoveries above 80%, was selected as optimal. Quantitative recoveries were obtained at decanoic acid amounts from 400 mg (Figure 3b) but MQL values increased linearly (Figure 3d) as a result of the higher volume of solvent used for the extraction (Figure 2a). So, 200 mg of decanoic acid were selected as optimal because it permitted recoveries higher than 80% and MQL values below $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for all the Sudan dyes. The recoveries kept constant as the amount of sample increased up to 1 g, which permitted to decrease the MQLs. Under the experimental conditions selected for the extraction, it was found that the volume of coacervate measured with a digital calliper ($328.9 \pm 0.4 \mu\text{L}$) was practically equal to that calculated by the general equation ($332 \mu\text{L}$), which confirmed the high capability of prediction of the equation used.

[30] Ballesteros-Gómez, A.; Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51

3.2.2. Influence of operational parameters

The optimisation of such parameters as extraction time and temperature and stirring rate was carried out in order to select those conditions under which the extraction became faster. None of these parameters modified the volume of supramolecular solvent yielded, so MQLs directly depended on the recoveries obtained for the dyes. The stirring rate influenced the kinetics of the extraction and consequently, more time was required to reach equilibrium conditions at the lowest stirring rates tested (600-1000 rpm). A value of 1200 rpm was selected as optimal since larger stirring rates did not reduce the extraction time. Equilibrium conditions were obtained after 10 min of extraction and this time was selected as optimal for further studies. The temperature scarcely influenced the extraction kinetics for Sudan dyes in the range investigated (20-60°C), so the whole procedure was carried out at room temperature. Recoveries for Sudans (I-IV) kept practically constant from pH 1 to 3 which is logical considering the type of interactions expected to be the driving forces for the extraction. Deprotonation of a fraction of decanoic acid at pH 4 resulted in a decrease in the amount of solvent yielded and consequently in a decrease in the recoveries obtained. So, a pH value around 3, adjusted with hydrochloric acid, is recommended for extraction. The effect of adding concentrations of NaCl up to 1 M to the samples was investigated in order to determine if they caused a salting out effect on the extraction of Sudan dyes. Salt did not influence the efficiency of the extraction process, so its addition to samples is not recommended. It was clearly observed in this study that the volume of coacervate increased linearly with the NaCl concentration. The slope of this linear relationship was 0.016 ± 0.001 μL of coacervate per mg of NaCl so the volume of coacervate increased at a rate of 1.6 μL per 100 mg salt. Such low rate was undetectable for the low concentrations of salt present in the samples but this increase of volume should be taken into account if samples with a high salt content are analysed.

3.3. Analytical performance

Calibration curves for Sudan dyes were run using standard solutions prepared in acetonitrile. No differences in peak areas or retention times were observed for the dyes injected in acetonitrile or the supramolecular solvent. Table 1 shows the sensitivities, expressed as the slope of the calibration curves, the linearity

ranges, the correlation coefficients and the detection limits of the method (MDL) proposed for the quantification of the different Sudan dyes, as well as the retention times and capacity factors for analytes. Method detection limits were calculated by extracting and analysing 11 aliquots (1 g) of blank tomato sauce (MDL = mean value + 3 x standard deviation).

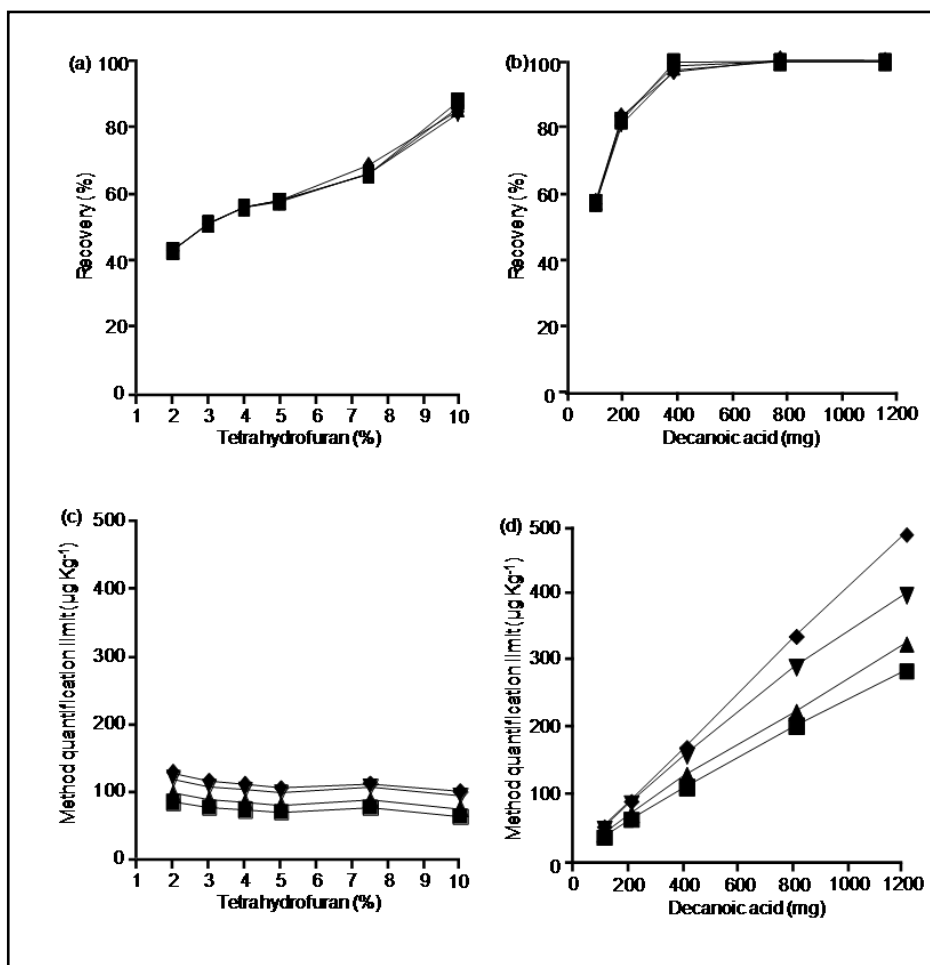


Figure 3. (a and b) Mean recoveries and (c and d) method quantitation limits obtained for Sudan dyes (■ Sudan I; ♦ Sudan II; ▼ Sudan III; ▲ Sudan IV) as a function of (a and c) tetrahydrofuran percentage and (b and d) amount of decanoic acid. Tomato sauce sample = 500 mg; (a) decanoic acid = 200 mg; (b) [THF] = 10%.

Table 1. Analytical performance of the method

Dye	Sensitivity \pm SD (AU ng ⁻¹)	MDL (μ g Kg ⁻¹)	Linear range (μ g Kg ⁻¹)	Correlation coefficient	Retention time \pm SD (min)	Capacity factor \pm SD (min) ^a
Sudan I	4352 \pm 50	4.2	28-2000	0.9997	19.97 \pm 0.11	8.99 \pm 0.07
Sudan II	3293 \pm 35	2.7	42-2000	0.9997	36.42 \pm 0.16	17.21 \pm 0.08
Sudan III	3479 \pm 32	6.5	40-2000	0.9998	50.62 \pm 0.13	24.31 \pm 0.07
Sudan IV	3925 \pm 44	7.4	32-2000	0.9997	71.12 \pm 0.11	34.56 \pm 0.06

^a Column void marker: acetone [31]

The relative standard deviation of the method, calculated from the analysis of 11 independent aliquots (1 g) of tomato sauce spiked with Sudan I-IV at the level of 300 ng g⁻¹ each, ranged between 3% and 7%. The accuracy of the quantitation of Sudan dyes in foodstuffs using external calibration was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves obtained from standards in acetonitrile with those obtained from 1 g of tomato sauce fortified with known amounts of Sudan dyes (33-1650 ng) and run using the whole procedure. Six different concentrations were used for construction of the calibration curve. The slopes and correlations coefficients (r) found for the dyes were (4071 \pm 60), (3255 \pm 37), (3479 \pm 61), (3925 \pm 62) and 0.9995, 0.9997, 0.9994, 0.9995, respectively. The differences found between these calibration slopes and that obtained in acetonitrile (4393 \pm 50), (3293 \pm 35), (3484 \pm 32) and (3989 \pm 44) were exclusively due to the percentages of recovery obtained for the dyes (e.g. mean recovery values of around 80–100% for Sudan I, II, III and IV, respectively), so calibration external is recommended for quantitation of the dyes in foodstuffs.

[31]Rimmer, C. A.; Simmons, C. R.; Dorsey, J. G. *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 219.

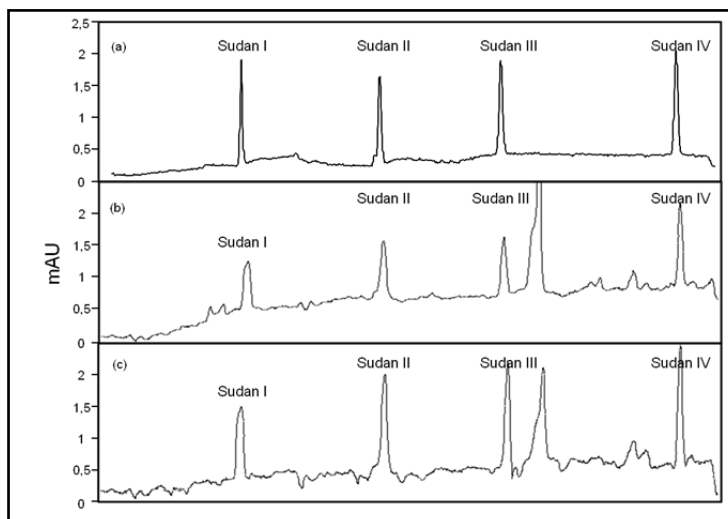


Figure 4. Chromatograms obtained from (a) a standard solution of Sudan dyes and 1 g of (b) tomato sauce and (c) vinegar sauce fortified with (b) twofold and (c) fivefold the MQL.

3.4. Analysis of chilli-containing foodstuffs

The suitability of the method for the determination of Sudan dyes in chilli-containing foodstuffs was assessed by analyzing three types of sauces (tomato, vinegar and sauce for meat), two brands each, all of them available in local supermarkets. Sudan dyes were undetected in the selected foods, so they were spiked into the samples at two concentration levels, namely two- and fivefold the method quantification limits (MQL for Sudan I, II, III and IV were 28, 42, 40 and 32 $\mu\text{g kg}^{-1}$, see in Table 1 the linear ranges). The recoveries obtained, expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations, are shown in Table 2. Recoveries for Sudans were always above 86% and the standard deviations varied from 2% to 7% thus indicating that the characteristics of the method were matrix-independent. Figure 4 shows the chromatograms obtained from the analysis of a standard solution and two different spiked samples. Identification of Sudan dyes was based on the respective retention times and absorbance spectra. Their confirmation was made through both peak purity testing and spectrum matching. Chromatograms were clear enough for the detection and quantitation of Sudan dyes in all the samples analysed.

Table 2. Mean recoveries \pm standard deviations (%) obtained after analysing spiked chilli-containing foodstuffs

Food	Brand	Spiking level ^a	Sudan I	Sudan II	Sudan III	Sudan IV
^b Tomato sauce	1	2xMQL	89 \pm 4	86 \pm 2	86 \pm 3	92 \pm 4
		5xMQL	87 \pm 3	96 \pm 5	96 \pm 2	108 \pm 7
	2	2xMQL	94 \pm 5	89 \pm 5	96 \pm 5	94 \pm 2
		5xMQL	86 \pm 2	89 \pm 4	95 \pm 5	90 \pm 3
^c Vinegar sauce	1	2xMQL	101 \pm 7	99 \pm 3	89 \pm 3	100 \pm 5
		5xMQL	92 \pm 4	85 \pm 3	90 \pm 4	91 \pm 4
	2	2xMQL	97 \pm 5	102 \pm 7	96 \pm 6	98 \pm 5
		5xMQL	86 \pm 4	87 \pm 3	100 \pm 4	99 \pm 4
^d Meat sauce	1	2xMQL	106 \pm 7	100 \pm 4	90 \pm 3	86 \pm 3
		5xMQL	97 \pm 3	99 \pm 3	91 \pm 4	92 \pm 4
	2	2xMQL	86 \pm 4	104 \pm 5	97 \pm 4	103 \pm 6
		5xMQL	88 \pm 5	91 \pm 3	90 \pm 5	100 \pm 5

^a MQL for Sudan I, II, III and IV: 28, 42, 40 and 32 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively
 Composition of foods according the container label (g 100 g⁻¹ food): ^b Fat: 0; Protein: 1.4; Carbohydrate: 18; Chilli: 0.5. ^c Fat: 0; Protein: 0.29; Carbohydrate: 0.59; Chilli: 28. ^d Fat: 2.4; Protein: 2.1; Carbohydrate: 8.6; Chilli: 1

4. Conclusions

The microextraction of Sudan dyes from foodstuffs with the supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid constitutes a valuable alternative to the current methodologies available for the extraction of these dyes, which are based on the use of 30-50 mL of toxic organic solvents followed by clean-up and/or solvent evaporation. Comparatively, the extraction approach proposed is simpler and faster since sample treatment just requires a single

extraction with an aqueous solution containing 4 mL of THF and 200 mg of decanoic acid, and no clean-up or solvent evaporation is necessary. As a result, the whole treatment procedure takes about 30 min and several samples can be simultaneously extracted, so sample throughput is considerably increased. There are additional assets associated with the proposed method; such as it requires only minute amounts of sample (1 g), features low cost (the consumption of organic solvent is greatly reduced and the use of SPE columns is avoided) and no special equipment is required for sample treatment. So, the method can be applied in routine analysis in labs without extra investment and it can be conveniently used in borders and markets to control the compliance of the European regulation (Commission Decision 2005/402/EC).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish MICINN (CTQ2008-01068). F.J. López-Jiménez acknowledges to the Spanish-MEC the doctoral fellowship awarded (AP2003-2840)

PARTE II
CAPÍTULO 4

**Restricted access property
supramolecular solvents for
combined microextraction of
endocrine disruptors in sediment
and sample cleanup prior to their
quantification by liquid
chromatography tandem mass
spectrometry**

**Restricted access property supramolecular solvents for
combined microextraction of endocrine disruptors in sediment and
sample cleanup prior to their quantification by liquid chromatography
tandem mass spectrometry**

Submitted to Journal of Chromatography A

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio

Abstract

A supramolecular solvent (SUPRAS) made up of inverted hexagonal aggregates of decanol was here proposed for the simultaneous microextraction of representative estrogenic disruptors (EDs) [viz. estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), 17 α -ethinylestradiol (EE2) and bisphenol A (BPA)] in sediments and sample cleanup. The SUPRAS contains aqueous cavities, the size of which can be tailored by controlling the environment for decanol self-assembly. The method involved the stirring of the sample (0.3 g of sediment) with 0.4 mL of SUPRAS for 10 min, subsequent centrifugation for extract separation from solid matrix components and direct analysis of the extract by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry (LC/QQQMS-MS). Driving forces for the microextraction of EDs in the SUPRAS involved both dispersion and hydrogen bond interactions. This mixed-mode mechanism resulted in high extraction efficiencies for EDs (viz. recoveries between 93 and 104%) and that allowed to reach low method detection limits (viz. 0.03, 0.3, 0.28, 0.4 and 0.08 ng g⁻¹ for E1, E2, E3, EE2 and BPA, respectively) without the need for extract evaporation. The size of the aqueous cavities of the SUPRAS selected was no large enough to allow humic acids to efficiently diffuse through them. So the SUPRAS behaved as a restricted access material for these macromolecules thus facilitating sample cleanup. The method was applied to the determination of the targeted EDs in sediments from three rivers in the Southern Spain. The concentrations found ranged between

below the MDL and 6.4 ng g⁻¹. The sample treatment here proposed greatly simplifies the procedures currently used for the determination of EDs in sediments using LC/MS-MS.

1. Introduction

The presence of chemicals in the environment that have the potential to interfere with the endocrine system of humans and wildlife has become a major concern worldwide⁽¹⁾. The group of natural [e.g. estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and estriol (E3)] and synthetic [e.g. 17 α -ethynylestradiol (EE2)] hormones, which have the highest estrogenic potential, and some xenoestrogens, with massive production and continuous discharge in the environment (e.g. bisphenol A, BPA), deserve particular attention, and a lot of research has been devoted to their analysis⁽²⁻⁴⁾.

Endocrine disruptors (EDs) enter the environment through the discharge of poorly or untreated domestic sewage into water bodies⁽⁵⁾. Most of them are relatively non-polar (Table 1), so we can expect EDs to accumulate in sediments, and in fact, concentrations up to 1000 times higher in bed sediments than in the overlying water column have been found⁽⁶⁾. Common concentrations of EDs in riverine and marine sediments are in the range from several pg g⁻¹ to a few ng g⁻¹⁽⁷⁻¹¹⁾ Among adverse effects, EDs have been known to cause abnormalities and impaired reproductive performance in wildlife, and congenital malformations, decrease in sperm numbers, hormone-related cancers and retarded sexual or neurobehavioural development in humans⁽¹⁾.

[1] European Commission. Endocrine Disruptors Website
http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/affect_en.htm

[2] G. Streck, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 635

[3] K. Wille, H.F. De Brabander, E. De Wulf, P. Van Caeter, C.R. Janssen, L. Vanhaecke, Trends. Anal. Chem. 35 (2012) 87

[4] V. Gabet, C. Miège, P. Bados, M. Coquery, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 1113

[5] S. Froehner, K. Skurupa-Machado, E. Stefan, T. Bleninger, E.C. da Rosa, C. de Castro-Martins, Mar. Pollut. Bull. 64 (2012) 75

[6] P. Labadie, E.M. Hill, J. Chromatogr. A, 1141 (2007) 174

[7] S. Reddy, B. J. Brownawell, Environ. Toxicol. Chem. 24 (2005) 1041

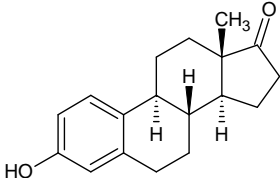
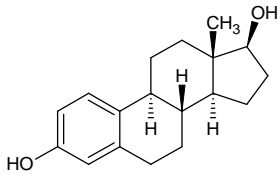
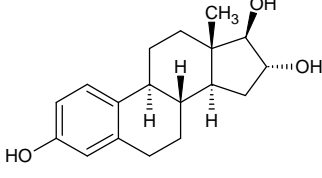
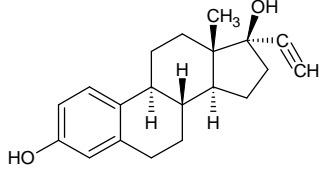
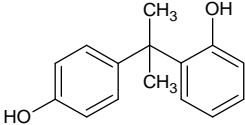
[8] T. Isobe, S. Serizawa, T. Horiguchi, Y. Shibata, S. Managaki, H. Takada, M. Morita, H. Shiraishi, Environ. Pollut. 144 (2006) 632

[9] B. Lei, S. Huang, Y. Zhou, D. Wang, Z. Wang, Chemosphere 76 (2009) 36

[10] J. Gong, Y. Ran, D.Y. Chen, Y. Yang, Mar. Pollut. Bull. 63 (2011) 556

[11] W.L. Chen, G.S. Wang, J.C. Gwo, C.Y. Chen, Talanta 89 (2012) 237

Table 1: Chemical structure, octanol-water partition coefficients, ionization constants and number of proton donors and acceptors for the target endocrine disruptors

Compound name	Structure	^a logK _{ow}	^a pK _a	^a H ⁺ acceptors/ donors
Natural Estrogens				
Estrone (E1)		3.62	10.25	2/1
17β-estradiol (E2)		4.15	10.27	2/2
Estriol (E3)		2.53	10.25	3/3
Synthetic Estrogen				
17α-ethynylestradiol (EE2)		4.11	10.24	2/2
Xenoestrogen				
Bisphenol A (BPA)		3.64	10.29	2/2

In recent years, mass spectrometry (MS), coupled to gas (GC) or liquid (LC) chromatography, have been the techniques of choice for quantifying EDs in the environment. GC-MS offers high separation power combined with good

identification capabilities, however LC-MS is preferred because derivatization is avoided and that eliminates potential sources of errors and speeds up ED analysis⁽²⁾. LC-MS² is the superior technique in terms of sensitivity (e.g. detection limits, LODs, are in the range 0.2-5 ng g⁻¹⁽⁴⁾), selectivity and suitability for confirmation. Concerning ionization techniques, electrospray ionization (ESI) is clearly ahead of atmospheric pressure chemical ionization (APCI). A major concern related to the use of LC-MS² is that it often requires extensive clean-up to remove interferences arising from matrix components that can affect ionization efficiency and, in coelution with compounds of interest, result in signal suppression.

Extraction of EDs from sediments is usually done with solvent extraction assisted by ultrasonication⁽¹²⁾ or microwaves⁽¹³⁾ and accelerated solvent extraction⁽¹⁴⁾. This step consists of 2-4 repetitive extractions, mostly performed with pure or mixed methanol and acetone⁽⁴⁾ followed by solvent evaporation. Recoveries are commonly in the range 60-130%. The use of polar solvents induces coextraction of many interferences and purification of extracts before analysis is mandatory. Sample cleanup is usually carried out by gel permeation chromatography (GPC), to remove matrix components with high molecular masses, followed by SPE with different sorbents (e.g. Strata X-AW and silica gel⁽⁶⁾, autopred EDS-1 and Florisil⁽⁸⁾) or a mixture of solvent extraction and SPE (e.g. LLE, Florisil, aqueous alkali extraction and hydrophilic-lipophilic balance enrichment⁽¹⁴⁾). Because of the complexity of these sample treatments, the development of simpler and faster extraction and cleanup procedures is highly desirable.

The research here presented was intended to develop a straightforward sample treatment for the quantitation of representative EDs in sediments by LC-MS² (see the target compounds in Table 1). Supramolecular solvents (SUPRAs) made up of inverted hexagonal aggregates of alkanols, that spontaneously form in a THF:water solution through self-assembly processes⁽¹⁵⁾, were investigated for this purpose. They were selected on the basis of their unique structure-derived properties that provide excellent opportunities to simultaneously extract analytes and clean samples.

[12] M.Y. Gross-Sorokin, S.D. Roast, G.C. Brighty, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 147

[13] J. Gong, Y. Ran, D.Y. Chen, Y. Yang, *Mar. Pollut. Bull.* 63 (2011) 556

[14] Q. Chen, J. Shi, W. Wu, X. Liu, H. Zhang, *Microchem. J.* 104 (2012) 49

[15] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, *Anal. Chem.* 84 (2012) 342

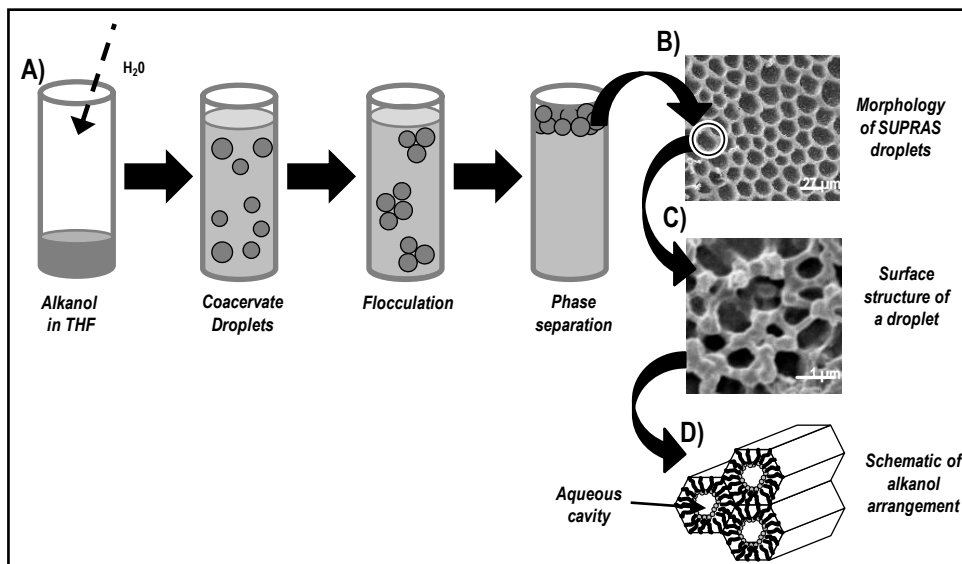


Figure 1. A) Schematic of the formation of alkanol-based SUPRASs in the bulk solution. B) Micrograph obtained by cryoSEM of the coacervate droplets of a decanol-based SUPRAS showing the hexagonal arrangement of the amphiphilic molecules (percentage of THF in the bulk solution = 30%). C) Micrograph obtained by cryoSEM showing the hexagonal pore structure of a coacervate droplet of a tetradecanol-based SUPRAS (percentage of THF in the bulk solution = 30%). D) Schematic of the hexagonal arrangement of alkanols in the SUPRAS.

Figure 1D shows a schematic of the structure of these solvents. They consist of aqueous cavities surrounded by the polar groups of alkanols with the hydrocarbon chains dissolved in THF and packed in a hexagonal arrangement. The two miscible solvents (*viz.* THF and water) do not mix in the SUPRASs thus establishing distinct, highly polar and nonpolar microenvironments that endow them with a high flexibility as separation media. The size of the aqueous cavities can be tailored by controlling the THF:water ratio in the bulk solution where alkanols self-assemble and, consequently, these solvents have the potential to behave as restricted access properties liquids. This means that they can exclude the extraction of macromolecules such as humic acids from sediments. In addition, alkanol-based SUPRAS provide a mixed-mode mechanism for dissolving medium polar and non-polar solutes (*viz.*, hydrogen bonding in the surfactant polar group and hydration water, and dispersion forces in the surfactant hydrocarbon chain), thus providing an effective means for isolating and concentrating such solutes.

In this work, the suitability of alkanol-based SUPRAS for combined ED extraction and sediment cleanup was assessed. Below, the most salient results of this study are described and discussed

2. Experimental

2.1 Chemicals

Reagents (analytical grade) and solvents were used as received. The following reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): estriol (E3), bisphenol A (BPA), 17β -estradiol (E2), 17α -ethinylestradiol (EE2), estrone (E1), 1-heptanol, 1-octanol, 1-decanol, 1-dodecanol and 1-tetradecanol. LC grade acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran were supplied by Panreac (Castellar del Vallès, Spain) and ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Stock solutions of 100 mg L^{-1} individual EDs were prepared in methanol. A 5-mL working solution containing 4 mg L^{-1} of each ED was weekly prepared by appropriate dilution of the stock solutions with methanol. Both stock and working solutions were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ under dark.

2.2 Apparatus

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap (Applied Biosystems MSD Sciex 4000TRAP, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurboIonSpray (TIS) interface. The stationary phase was an Ultrabase C18 column (particle size $5\mu\text{m}$, i.d. 4.6 mm, length 25 cm) from Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain). All data were acquired and processed using the Analyst 1.5.1 Software. A magnetic stirrer Basicmagmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4x100 mL (ref. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for SUPRAS production. Two mL-microtubes Safe-Lock from Eppendorf Iberica (Madrid, Spain), glass balls (3 mm diameter) from Albus (Córdoba, Spain), a Reax Heidolph vortex (Schwabach, Germany), with an attachment for 10 test tubes, and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL (Ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warschaw, Poland) were used for sample preparation and extraction. The volume obtained of SUPRAS under different experimental

conditions was measured with a digital caliper from Medid Precision, S.A. (Barcelona, Spain).

2.3. Supramolecular solvent production

The procedure below detailed, which permits to obtain a SUPRAS volume (~4 mL) able to treat 10 sediment samples, was routinely followed. 1-decanol (3 mL) was dissolved in THF (8 mL) in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 69 mL of ultra-high-quality water were added. The mixture was magnetically stirred for 5 minutes, time in which the SUPRAS spontaneously formed in the bulk solution, and centrifuged at 3500 rpm for 10 min to accelerate the separation of the SUPRAS from the decanol-poor bulk solution. Next, the SUPRAS, which is less dense than the bulk solution, was withdrawn using a 5 mL-syringe, transferred to a hermetically closed storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4 °C. Under these conditions, the solvent produced was stable for at least one month. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant decanol/THF/water proportion.

2.4. Determination of endocrine disruptors in sediments

2.4.1. Sample collection and preservation

Superficial sediment samples (approximately 0-5 cm) were collected on Rabanales stream and Guadajoz and Guadalquivir rivers at several locations near Córdoba (Southern Spain) in November 2012. Samples were taken using a stainless steel scoop, stored in stainless steel boxes and immediately transferred to the laboratory, where they were lightly ground with a mortar, sieved at 1 mm and frozen at -20°C. Then, the samples were freeze-dried and stored at -20 °C in stainless steel boxes until analysis.

2.4.2. Sample spiking

Spiking of blank sediments with EDs at the level of 10 ng g⁻¹ was carried out with two aims; to study sample representativity and to optimize the microextraction of EDs with SUPRASs. In the first case, around 6 g of sample were placed in a flat vessel and covered with 16 mL of a methanolic solution of the target

analytes. The mixture was allowed to stand at room temperature for at least 1 h to allow sorption processes to occur and then, methanol was evaporated to complete dryness under a gentle nitrogen stream. For optimization studies, aliquots of 300 mg of lyophilized sediment were weighted into a 2-mL eppendorf tube and 800 μ L of a methanolic solution containing the target analytes were added and allowed to stand for 1 h. Then, the methanol was evaporated to complete dryness under a nitrogen stream.

2.4.3. SUPRAS-based microextraction of EDs

A portion (about 300 mg) of the freeze-dried sediment was weighted, after thawing, into an eppendorf tube. Then, 400 μ L of supramolecular solvent were added. Three spherical glass pearls (3 mm of diameter) were introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by sample vortex-shaken at 2500 rpm for 10 min. Then, the samples were centrifuged at 15000 rpm for 10 minutes. The supramolecular extract was withdrawn using a microsyringe and transferred to an auto-sampler vial.

2.4.4. Quantification of EDs by LC(ESI)-QQQ-MS²

The target EDs were separated and quantified by using LC coupled with a turbo spray interface operating in the negative ion mode prior to the Qtrap mass spectrometer. Quantitative analyses were performed on the Scheduled MRM mode recording the transition between the precursor ion and the most abundant product ion. Table 2 shows the quantifier ions used. The injection volume used was 10 μ L. The mobile phase consisted of acetonitrile and water at a flow rate of 0.26 mL min⁻¹ and the gradient elution was programmed as follows: 60% of acetonitrile for 10 minutes, then to 82% acetonitrile in 2 minutes and next, isocratic conditions for 16 min. The temperature for the analytical column was set at 25 °C. The eluates from the analytical column were diverted by the switching valve to waste from 0 to 5 and from 7 to 10 min in order to prevent the mass spectrometer from the entrance of other matrix components or decanol. The turbo spray settings were as follows: curtain gas (N₂) 30 psi; ion spray voltage -4500 V; temperature 550°C; nebulizer gas 50 psi, and turbo gas 55 psi. Declustering potential, collision energy and collision cell exit potential were optimized for each analyte (Table 2). Calibration curves were constructed from standards in SUPRAS. For this purpose, 200 μ L of SUPRAS were

mixed with 20 μL of a methanolic solution containing the EDs at proper concentrations to give final concentrations in the ranges 0.07-75, 0.55-75, 0.53-75, 0.94-75 and 0.15-75 $\mu\text{g L}^{-1}$ for E1, E2, E3, EE2 and BPA, respectively. These solutions were homogenized by vortex-shaken for 1 min before analysis.

Table 2: Quantifier ions and MS parameters used to determine EDs in sediments

Target compound	MRM transitions	Decustering Potential	Collision Energy	Collision Cell Exit Potential
E1	269.2/145.2	-73.00	-53.00	-21.81
E2	271.0/145.2	-80.00	-55.00	-21.81
EE2	295.2/145.2	-80.00	-55.00	-22.77
E3	287.2/171.2	-90.00	-50.00	-22.47
BPA	227.1/133.0	-50.00	-33.00	-20.25

3. Results and discussion

3.1 Microextraction of endocrine disruptors

3.1.1. SUPRAS synthesis, description and extraction capabilities

The synthesis of alkanol-based SUPRASs occurs spontaneously as water is added to solutions of alkanols in THF⁽¹⁵⁾. Water, a poor solvent for these amphiphiles, induces their aggregation and causes the formation of oily droplets that flocculate through the formation of conglomerates of individual droplets. These conglomerates separate from the bulk solution as a new liquid phase in which alkanols arrange in hexagonal structures, both at the micro and nano level (Figure 1). The inverted hexagonal arrangement of alkanols results in two distinct polarity microenvironments that provide excellent opportunities to develop outstanding applications in analytical processes.

The global composition of the solvent, the size of the oily droplets that form it, and the aqueous cavities of the inverted hexagonal structures can be tailored by controlling the THF:water ratio in the bulk solution that is the environment for alkanol self-assembly. So, these SUPRASs are considered as environment-responsive and their characteristics can be reversed at will. The THF:water ratio in

the bulk solution also determines the volume of solvent produced from a given amount of alkanol.

Both SUPRAS composition and volume can be accurately predicted from the following, previously derived, equations⁽¹⁵⁾:

$$Y_{ws} = 42,2 - 0.31X_{wb} - 0.998Z_a \quad (1)$$

$$Y_{ts} = 6.3 + 2.4X_{tb} - 0.024X_{tb}^2 \quad (2)$$

$$Y = X [0.17 + e^{0.0389Z}] \quad (3)$$

where Y_{ws} and X_{wb} are the mass fraction of water in the SUPRAS and bulk solution, respectively, Z_a is the number of carbon atoms in the alkanol, Y_{ts} and X_{tb} are the mass fraction of THF in the SUPRAS and bulk solution, respectively, and Y is the volume of SUPRAS (μL) produced in the bulk solution from a given amount of alkanol (X , mg) and percentage of THF (Z , v/v).

The size of the coacervate droplets (e.g. ~ 1 -5, ~ 5 -20, ~ 20 -40, ~ 40 -60, ~ 60 -100, and ~ 100 -200 μm for decanol self-assembled in environments containing 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 60% THF, respectively), and more interestingly, the size of the aqueous cavities in the hexagonal structure (e.g. ~ 0.05 -0.5 μm for 10-60% THF) are THF-dependent, that offering the possibility to use these SUPRASs as restricted access materials for polar/ionic high molecular mass matrix components.

The alkanol aggregates making up the solvent offer a twofold mechanism for analyte solubilization, namely dispersion interactions in the hydrophobic tails and hydrogen bonds in the polar headgroups and aqueous cavities. The targets EDs (Table 1) are medium polar/nonpolar analytes containing both hydrogen donors and acceptors and therefore the forces driving extraction are expected to be both dispersion and hydrogen bonding.

3.1.2. Optimization

The experimental variables investigated were both those related to the extractant (e.g. chain length of the alkanol and volume and composition of the SUPRAS) and the operational parameters (e.g. rate and time of stirring and temperature). The experimental conditions selected as optimal were those providing

quantitative recoveries and minimal method quantitation limits (MQLs) for the determination of the target EDs. MQLs were calculated from the instrumental quantitation limits obtained (0.07, 0.55, 0.53, 0.94 and 0.15 $\mu\text{g L}^{-1}$ for E1, E2, E3, EE2 and BPA, respectively), the volume of SUPRAS used for extraction, the recovery percentages obtained and the sample weight used for analysis. Sediment samples (300 mg) containing no EDs at detectable concentrations were fortified with 10 ng g^{-1} of each ED and analyzed. The results were calculated as a mean of triplicate measurements.

SUPRASs made up of ($\text{C}_7\text{-C}_{14}$) alkyl alcohols were investigated for extraction of EDs. For this purpose, the SUPRASs were synthesized from 3% (v/v) alkanol and 20% (v/v) THF according to the procedure specified in section 2.3. Aliquots of 800 μL of SUPRASs were used in all the experiments. Quantitative extraction recoveries ($\sim 100\%$) for EDs were only obtained from SUPRASs made up of decanol, a medium length hydrocarbon chain alcohol, so it was selected for further experiments. Recoveries gradually decreased for both longer and shorter hydrocarbon chain alcohols. A probable explanation for these results is that short chain alcohols are better proton donors than longer alcohols whereas long chain alcohols provide stronger dispersion interactions, so medium length alcohols represent a compromise between the strength of both extraction forces. Under the selected chromatographic conditions (section 2.4.4), decanol did not coelute with analytes, that allowing to send it to waste before entering the mass spectrometer.

As it has been above described (section 3.1.1), the content of THF in the bulk solution influences SUPRAS composition and structure and consequently, it could affect extraction recovery and selectivity. SUPRASs of different composition were prepared from a constant concentration of decanol (3%, v/v) and variable percentages of THF (5-30%, v/v) and a volume of 800 μL was used to extract the target compounds from fortified (10 ng g^{-1}) 300-mg sediment samples. In parallel, non-fortified samples were analyzed to assess the influence of the SUPRAS composition on the cleanliness of the extracts.

Table 3 shows the composition of the SUPRASs investigated for extraction, as calculated from equations 1 and 2, and the composition of the bulk solution from which they were synthesized. It also shows the volume of solvent produced, as predicted by equation 3. Both the water and THF content in the SUPRASs, as well

Table 3 : Mean recoveries and standard deviations obtained for the target endocrine disruptors as a function of decanol-based SUPRAS of different composition

% THF in the bulk solution (v/v)	^a Bulk composition (mass fraction)			^b SUPRAS composition (mass fraction)			^c SUPRAS volume (mL)	^d Recovery \pm s (%)				
	decanol	TH	water	decanol	TH	water		E1	E2	E3	EE2	BPA
5	0.032	0.045	0.923	0.798	0.166	0.036	3.4	91 \pm 6	76 \pm 4	95 \pm 5	80 \pm 4	93 \pm 4
10	0.032	0.090	0.878	0.689	0.261	0.050	4.1	98 \pm 2	98 \pm 3	102 \pm 2	103 \pm 4	100 \pm 2
15	0.032	0.136	0.832	0.590	0.346	0.064	4.9	99 \pm 7	98 \pm 2	99 \pm 2	101 \pm 3	102 \pm 2
20	0.032	0.183	0.785	0.499	0.422	0.079	5.8	105 \pm 2	99 \pm 4	99 \pm 6	103 \pm 3	100 \pm 7
25	0.032	0.230	0.738	0.418	0.488	0.093	7.0	100 \pm 9	104 \pm 7	98 \pm 1	97 \pm 5	102 \pm 3
30	0.032	0.278	0.690	0.344	0.548	0.108	8.4	104 \pm 5	99 \pm 4	99 \pm 2	103 \pm 8	99 \pm 6

^a Decanol=3 mL (2.4891 g), volume of the bulk solution=80 mL

^b Calculated from equations 1 and 2

^c Calculated from equation 3

^d 300 mg of sediment fortified with 10 ng g⁻¹ of each ED

^e Standard deviation (n=3)

as the volume of solvent produced, increased as the percentage of THF in the bulk solution did. As a result, the solvent became increasingly diluted with respect to the alkanol despite nearly all the surfactant was always transferred from the bulk solution to the SUPRAS during the self-assembly process. Solvent composition did not influence the extraction efficiency for EDs at percentages (v/v) of THF in the bulk solution equal or above 10%. No appreciable extraction of humic acids occurred in the interval of solvent compositions investigated. Extracts were clean enough to inject them directly in the chromatographic system and no enhancement or suppression of analyte ionization was detected. So, the decanol-based SUPRAS both extracted efficiently EDs and acted as a restricted access material for humic acids which were excluded from extraction. A SUPRAS made up of 68.9% decanol, 26.1% THF and 5% water was selected as optimal for extraction and sample cleanup.

Table 4 shows the recoveries and MQLs obtained for EDs as a function of the volume of SUPRAS used for extraction. Recoveries were nearly 100% for all the EDs at SUPRAS volumes equal and above 0.4 mL. Since MQLs decrease with the volume of extractant, 0.4 mL was selected as optimal. At this volume, the calculated MQLs for the target EDs ranged between 0.09 and 1.27 ng g⁻¹.

The time of extraction was investigated in the interval 5-30 min at room temperature. About 10 min were required to achieve recoveries nearly 100% for all the EDs. Effective separation of particles from the SUPRAS was reached after centrifugation for 10 min.

To evaluate the representativity of the amount of sediment subsample used for analysis, the variances obtained for the measurement of EDs in 300-mg sediment subsamples fortified with 10 ng g⁻¹ of each ED were compared with those obtained from the measurement of 300-mg aliquots taken from 6 g sediment sample spiked at the same concentration level. No statistically significant differences between both variances were observed by applying a Fisher test⁽¹⁶⁾. The experimental F-values were in the interval 1.52-2.01 and were below the critical F-value (2.98, n₁=n₂=11, significant level=0.05).

[16] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education, Harlow, 5th ed., 2005

Table 4 Mean recoveries and method quantification limits obtained for the target endocrine disruptors as a function of the volume of supramolecular solvent used for extraction.

Target compound	Volume of supramolecular solvent (mL)													
	0.2		0.25		0.3		0.4		0.5		0.8		1	
	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)	^a R±	MQL (ng g ⁻¹)
	^b S(%)		^b S(%)		^b S(%)		^b S(%)		^b S(%)		^b S(%)		^b S(%)	
E1	32±4	0.01	31±1	0.02	79±3	0.06	98±2	0.09	97±4	0.11	100±5	0.19	102±3	0.24
E2	33±5	0.12	47±2	0.22	89±2	0.49	100±3	0.73	99±2	0.91	99±7	1.45	100±1	1.83
E3	18±2	0.06	26±3	0.11	65±4	0.34	96±2	0.68	103±3	0.91	99±3	1.40	97±4	1.71
EE2	23±3	0.14	30±3	0.24	81±7	0.76	101±4	1.27	96±3	1.50	103±2	2.58	102±2	3.20
BPA	37±5	0.04	45±4	0.06	80±5	0.12	98±1	0.20	101±6	0.25	102±3	0.41	93±6	0.47

^a Recovery for 300 mg of sediment spiked with 10 ng g⁻¹ of each ED^b Standard deviation, n=3

3.2. Analytical performance

3.2.1. Sensitivity and linearity

Calibration curves were run using six standard solutions prepared in the supramolecular solvent. The linear range was confirmed by the visual inspection of the plot residuals versus analyte amount⁽¹⁷⁾; the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained. Linearity was achieved in the ranges specified in section 2.4.4. Correlation between peak areas and ED concentrations was determined by linear regression and 1/x weighted calibration. Correlation coefficients were in the range 0.992-0.9992 for all analytes indicating good fits.

The method detection limits (MDLs) were calculated from six independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.4) of sediment samples, containing no detectable levels of EDs, by using a signal-to-noise ratio of 3 (the ratio between the peak areas for each target analyte and peak area of noise). MDLs were 0.03, 0.3, 0.28, 0.4 and 0.08 ng g⁻¹ for E1, E2, E3, EE2 and BPA, respectively. A typical chromatogram obtained from a standard solution in SUPRAS containing 4.5 µg L⁻¹ of each ED is shown in Figure 2A.

3.2.2. Selectivity

The accuracy of the quantification of EDs in sediments using external calibration was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves (n=6) obtained from standards in SUPRAS with those obtained from 300 mg of sediment samples fortified with known amounts of the target analytes (1.5-100 ng g⁻¹) and run using the whole procedure (see section 2.4). The difference between slopes was found to be not statistically significant by applying a Student's *t* test⁽¹⁸⁾. The experimental *t*-values for E1, E2, E3, EE2 and BPA were 2.75, 1.42, 2.61, 1.10 and 1.08, respectively. These values were below the critical *t* value (3.17, significant level = 0.01). Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of EDs.

[17] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series*, vol. 20A, Elsevier, Amsterdam, 1997

[18] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471

Table 5 Mean concentration and recoveries, along with their respective standard deviations, obtained from the determination of endocrine disruptors in non fortified and fortified sediment samples.

Endocrine disruptor	Rabanales			Guadalquivir			Guadajoz		
	^a Concentration found \pm^b S (ng g ⁻¹)	^c Recovery \pm^b S (%)	^d Recovery \pm^b S (%)	^a Concentration found \pm^b S (ng g ⁻¹)	^c Recovery \pm^b S (%)	^d Recovery \pm^b S (%)	^a Concentration found \pm^b S (ng g ⁻¹)	^c Recovery \pm^b S (%)	^d Recovery \pm^b S (%)
E1	1.4 \pm 0.1	95 \pm 5	97 \pm 6	<MQL	99 \pm 2	98 \pm 2	ND	95 \pm 4	101 \pm 2
E2	0.87 \pm 0.05	96 \pm 4	101 \pm 3	ND	103 \pm 6	105 \pm 8	ND	101 \pm 3	97 \pm 4
E3	ND	100 \pm 8	98 \pm 2	ND	96 \pm 4	104 \pm 2	ND	101 \pm 1	104 \pm 8
EE2	ND	96 \pm 2	93 \pm 6	ND	105 \pm 3	98 \pm 6	ND	100 \pm 6	97 \pm 6
BPA	6.40 \pm 0.08	101 \pm 6	99 \pm 5	1.15 \pm 0.04	99 \pm 2	103 \pm 9	2.04 \pm 0.07	105 \pm 7	99 \pm 1

^a Mean for three independent determinations from the analysis of non fortified samples

^b Standard deviation

^c Sample spiked with 5 ng g⁻¹ of each ED

^d Sample spiked with 10 ng g⁻¹ of each ED

ND = non detected

3.2.3. Precision

The precision of the method was evaluated by extracting 8 independent fortified (10 ng g^{-1}) sediment samples. The values, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 1 and 9% for all the EDs.

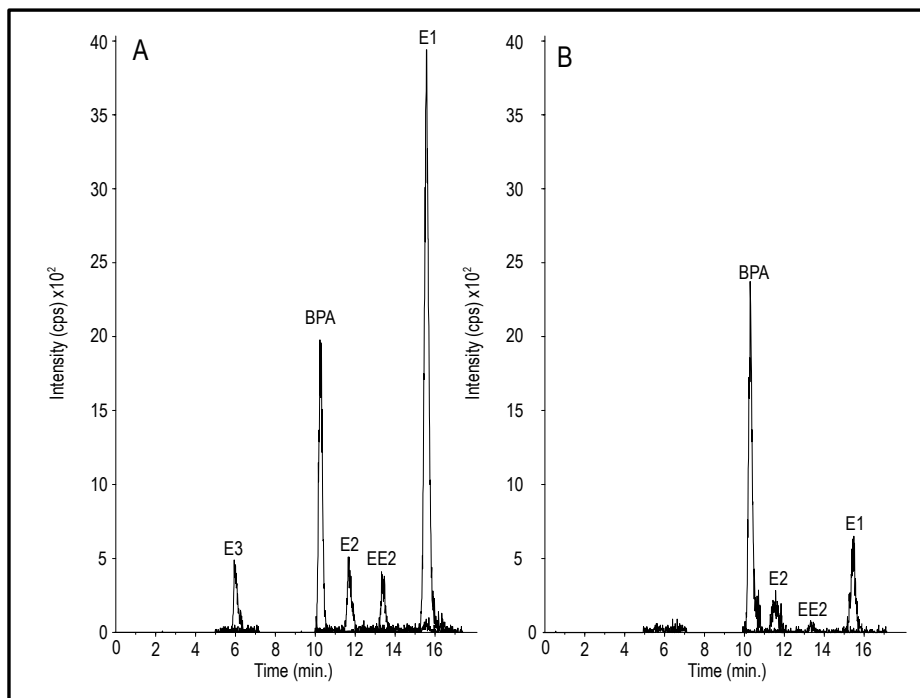


Figure 2. LC(ESI)-QQMS² selected ion chromatograms of EDs obtained from A) a standard solution containing $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of each ED, and B) a sediment sample collected in Rabanales stream.

3.3. Analysis of sediments

Non-fortified and fortified sediment samples from three rivers named Guadalquivir, Guadajoz and Rabanales, all of them flowing through the province of Córdoba (Southern Spain), were analyzed to prove the suitability of the proposed method to determine EDs. Table 5 shows the concentration obtained from non fortified samples, expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. BPA was found in all the samples analyzed whereas the natural estrogens were only found at quantifiable levels in the

Rabanales stream. The synthetic estrogen EE2, if any, was at not detectable levels in the samples analyzed.

Recoveries for EDs were assessed from samples spiked at two concentration levels, 5 and 10 ng g⁻¹. Recoveries obtained ranged between 93 and 104% with relative standard deviations from 1 to 10%. Figure 2B shows a representative chromatogram obtained in the analysis of a sample of sediment collected in the Rabanales stream.

4. Conclusions

It has been proved that SUPRASs made up of inverted hexagonal aggregates of alkanols have the potential for combined analyte extraction an sample cleanup and consequently, they are valuable solvents for simplifying sample treatment in the analysis of complex matrices. Both the operational and analytical features of the method here proposed are superior to those of the sample treatments previously reported for the determination of EDs in sediments using LC/MS-MS. The major benefit of the present method is that both extraction and cleanup is carried out in a single step which takes only 10 min and requires a solvent volume as low as 0.4 mL. Implementation of this sample treatment only requires conventional lab equipments and several samples can be simultaneously processed. Accurate quantitation is obtained using solvent-based calibration and sensitivity (MDLs in the range 0.03-0.4 ng g⁻¹) approaches that offered by the mass spectrometer (dilution factor around 1.3) without the need for solvent evaporation. This sensitivity is similar to that previously reported for EDs in sediments (e.g. 0.02-0.32 ng g⁻¹(8), 0.015-0.04 ng g⁻¹(6), 2-4 ng g⁻¹(19), 5 ng g⁻¹(20), 0.1 ng g⁻¹(14), 0.03-0.04 ng g⁻¹(7), 0.01-0.60 ng g⁻¹(21), 0.05-0.14 ng g⁻¹(22)).

[19]T. A. Ternes, H. Andersen, D. Gilberg, M. Bonerz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3498

[20] K. Hajkova, J. Pulkrabova, J. Schurek, J. Hajslova, J. Poustka, M. Napravnikova, V. Kocourek, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1351

[21]S. Kinani, S. Bouchonnet, S. Bourcier, N. Creusot, J.M. Porcher, S. Ait-Aissa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 3651

[22]A. Hibberd, K. Maskaoui, Z. Zhang, J.L. Zhou, *Talanta* 77 (2009) 1315

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MINECO (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151).

PARTE II

CAPÍTULO 5

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in food by vesicular supramolecular solvent-based microextraction and LC-fluorescence detection

**Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4)
in food by vesicular supramolecular solvent-based microextraction and
LC-fluorescence detection**

Submitted to Food Chemistry

Francisco José López-Jiménez, Ana Ballesteros-Gómez and Soledad Rubio

Abstract

A solventless microextraction was proposed for the development of a simple and fast sample treatment for the determination of PAH4 [viz. benz[*a*]anthracene (BaA), chrysene (Chry), benzo[*b*]fluorantene (BbF) and benzo[*a*]pyrene (BaP)], which is considered by the European Food Safety Authority (EFSA) as the most suitable indicator for the estimation of the carcinogenic potency of PAHs in food. The method involved the stirring of 200 mg of foodstuff with 200 μL of a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of decanoic acid/tetrabutylammonium decanoate vesicles for 10 min. Then, the sample was centrifuged for 10 min and the target PAHs were quantified in the extract by liquid chromatography/fluorescence detection (LC-FD) against solvent-based calibration curves. Neither dilution nor further clean-up steps of the extracts were needed and quantitation of PAH4 was interference-free. The limit of quantitation of the method ($0.3\text{-}0.7 \mu\text{g Kg}^{-1}$) was below the threshold limit established for BaP in different categories of food by EU directives ($1\text{-}10 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Representativity of subsamples was proven. The method was successfully applied to the analysis of food belonging to different categories for which maximum levels of BaP have been set, namely smoked meat and fish ($5 \mu\text{g Kg}^{-1}$), bivalve mollusks ($10 \mu\text{g Kg}^{-1}$), and processed cereal-based food for infants ($1 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Fat, protein and carbohydrate content of the analyzed foodstuffs ranged in a wide interval. BaP was quantified and/or

detected in most of the analyzed samples at concentrations far below the threshold limits and recoveries for the four PAHs ranged between 92 and 103% with relative standard deviations between 2 and 5%. This solventless sample treatment allows quick and simple microextraction of PAH4. The proposed method delivers accurate and precise data and meets the requirements to be used for the routine analysis of PAH4 in food.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of compounds considered of priority concern by health and environment administrations all over the world on the basis of their mutagenic and carcinogenic effects⁽¹⁾. Humans are generally exposed to PAHs through inspired air and food. Contamination of food by PAHs arises from environmental sources (e.g. deposition from the air on the surface of plants, intake by marine organisms in polluted zones, etc) and food preparation (e.g. grilling, roasting or smoking)⁽²⁻³⁾

In order to protect public health, the European Community (EC) has regulated the presence of PAHs in food⁽⁴⁾. In this regulation, benzo[a]pyrene (BaP) was selected as a marker for the occurrence and effect of carcinogenic PAHs, according to the suggestion of the Scientific Committee on Food (SCF) and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), and maximum residual limits (MRLs) for BaP in selected foodstuffs were set in the range 1-10 µg/Kg (e.g. in fats and oils, smoked and dried foods, fish, crustaceans and bivalve mollusks, and food for infants and young children).

A later report of the European Food Safety Authority has shown that there are better markers of the total content of PAHs in food than BaP⁽⁵⁾. This conclusion was drawn from the determination of 16 priority PAHs (viz. the SCF and JECFA list) in 9714 samples belonging to different food categories. The results showed that

[1] IARC (International Agency for Research on Cancer). (2010). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 92. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon. URL <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf> Accessed: 14.01.13

[2] Wenzl, T.; Simon, R.; Kleiner, J.; Anklam, E. *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716

[3] Šimko, P. J. *Chromatogr. B*, 770(2002) 3

[4] European Commission Regulation No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union of 20 Decembre* (L 364/5).

[5] EFSA. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal*. 724, 1-114.

several carcinogenic PAHs were detected in about 33% of the samples analyzed, despite the concentration of BaP was below the detection limit. On the basis of this study, the Panel on Contaminants in the Food Chain from EFSA⁽⁵⁾ concluded that the following PAHs: BaP, chrysene (Chry), benz[*a*]anthracene (BaA), benzo[*b*]fluoranthene (BbF) (named as PAH4) and additionally, benzo[*k*]fluoranthene (BkF), dibenz[*a,b*]anthracene (DBahA), benzo[*g,h,i*]perylene (BghiP) and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (named as PAH8) are currently the only possible indicators for the carcinogenic potency of PAHs in food, with PAH8 not providing much added value compared to PAH4.

Both LC-fluorescence⁽⁶⁻⁹⁾ and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)⁽¹⁰⁻¹²⁾ are well suited to the quantitation of PAHs in food. So, current research in this area mainly focuses on the development of more efficient, faster, simpler, cheaper and environmentally friendly sample treatment procedures. Common preparation techniques include conventional solvent extraction^(6,9), ultrasound-assisted extraction⁽⁸⁾ and accelerated solvent extraction.^(8,10,12) Repetitive extractions with 2-3 aliquots of 10-20 mL of chlorinated solvents are usually required to ensure high recoveries of PAHs. Alkaline hydrolysis of proteins, which takes usually 2-4 hours, is frequently recommended prior to solvent treatment^(3,13). After extraction, evaporation of extracts and a multistep clean-up procedure, usually including SPE with different sorbents^(8,10,12,14,15), complete sample treatment. In order to simplify these complex procedures, some QUECHERS-based methods have been developed for the determination of PAHs in seafood^(16,17) and high fat salmon⁽¹⁸⁾ combined with GC-MS. A mixture of solvents (e.g. acetone, ethyl acetate and isooctane) has been proposed to efficiently extract PAHs from biomatrices with fat content above 3%

[6] Danyi, S.; Brose, F.; Brasseur, C.; Schaneider, Y.-J.; Larodelle, Y.; Pussemier, L.; Robbens, J.; De Saeger, S.; Maghuin-Rogister, G.; Scippo, M.-L. *Anal. Chim. Acta* 633(2009) 293

[7] Akpambang, V.O.E.; Purcaro, G.; Lajide, L.A.; Amoo, I.A.E.; Conte, L.S.B.; Moret, S.B. *Food Addit. Contam., Part A* 26 (2009) 1096

[8] Rey-Salgueiro, L.; Martínez-Carballo, E.; García-Falcón, M.S.; González-Barreiro, C.; Simal-Gándara, J. *Food Chem.* 115 (2009) 814.

[9] Windal, I.; Boxus, L.; Hanot, V. *J. of Chromatogr. A* 1212 (2008) 16

[10] Jira, W. *Eur. Food Res. Technol.* 230 (2010) 447

[11] Houessou, J.K.; Deltell, C.; Camel, V. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7413

[12] Ziegenhals, K.; Hübschmann, H.-J.; Speer, K.; Jira, W. *J. Sep. Sci.* 31(2008)1779

[13] Yebra-Pimentel, I.; Fernández-González, R.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J. *Food Chem.* 135(2012) 2043

[14] Farhadian, A.; Jinap, S.; Abbas, F.; Sakar, Z.I. *Determination. Food Control* 21(2010) 606

[15] Berntssen, M.H.G.; Julshamn, K.; Lundebye, A.-K. *Chemosphere* 78 (2010) 637

[16] Ramalhosa, M.J.; Paiga, P.; Morais, S.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M.B.P.P. *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529

[17] Smoker, M.; Tran, K.; Smith, R.E. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12101

[18] Forsberg, N.D.; Wilson, G.R.; Anderson, K.A. *J. Agric. Food Chem.* 59(2011)8108

since the traditional QUECHERS based on acetonitrile lead to poor recoveries in these types of samples.

In this paper, supramolecular solvents (SUPRASs) are explored for the simultaneous extraction and sample clean-up of PAH4 from a variety of foods belonging to different food categories covered by Regulation EC 1881/2006(4). The aim was to develop a simple, fast, quantitative, cheap and environmentally friendly sample treatment prior to LC-fluorescence detection for the routine determination of a suitable indicator (viz. PAH4) for the carcinogenic potency of PAHs in food(5).

SUPRASs(19), also referred to as cocervates(20-21) and surfactant liquid-liquid phase separation(22), are nanostructured liquids made up of three-dimensional aggregates of amphiphilic compounds. SUPRASs are generated through self-assembly processes, induced by changes in the environmental conditions of aqueous or hydroorganic solutions of the amphiphile (e.g. pH modification, salt addition, presence of a nonsolvent for the amphiphile, etc). Self-assembly causes the spontaneous separation of an amphiphile-rich liquid phase from the bulk solution.

Among SUPRAS intrinsic properties, some of them are very attractive to replace organic solvents in analytical extractions. Thus, SUPRASs have regions of different polarities that provide a variety of interactions for analytes. The type of interaction may be tuned varying the hydrophobic or the polar group of the surfactant and in theory one may design the most appropriate extractant for a specific application(22) because amphiphiles are ubiquitous in nature and synthetic chemistry. A second major feature of SUPRASs is the high concentration of amphiphiles, and therefore of binding sites, they contain (typically 0.1-1 mg μL^{-1}). This characteristic permits to achieve high extraction efficiencies using low extractant volumes, which is requisite in microextractions. Additional interesting properties for extractions include non-volatility and non-flammability, which permits the implementation of safer processes, and the use of self-assembly based synthetic procedures that are within everyone's reach.

[19] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A*, 1216(2009)530

[20] Jin, X.; Zhu, M.; Conte, E.D. *Anal. Chem.* 71 (1999)514

[21] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Perez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229

[22] Yazdi, A.S Surfactant-based extraction methods. *Trends Anal. Chem.* 30(2011)918

Progress on both theoretical and practical aspects related to the use of SUPRASs in analytical extractions of organic compounds reported over the last decade have been reviewed⁽²³⁾. Applications have mainly focused on the extraction of PAHs, surfactants, pharmaceuticals, vitamins, drugs, dyes and phenols in environmental and or biological matrices. Application of SUPRASs to agrifood matrices (Ballesteros-Gómez et al.⁽²³⁾ and references herein) is scarce and mainly centered in the extraction of pesticides from fruits and cereals, dyes in sauces and fish, mycotoxins in wine and cereals, pharmaceuticals in fish and bisphenol A in canned food. To our knowledge, the only application of SUPRASs related to PAHs in food is the extraction of BaP in tea and coffee using a SUPRAS made up of reverse micelles of decanoic acid⁽¹⁹⁾.

This paper reports the evaluation of a SUPRAS made up of vesicles of octanoic acid (viz. a biosurfactant) and tetrabutylammonium, Bu₄N⁺ (viz. the coacervating agent)⁽²¹⁾ for the extraction of BaA, Chry, BbF and BaP (PAH4) from food. The variables affecting the efficiency and kinetics of the supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) were studied, the analytical features of the proposed SUSME-LC-Fluorescence method were evaluated and it was successfully applied to the determination of PAH4 in non-spiked and spiked food samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Octanoic acid was obtained from Sigma (St. Louis MO, USA), tetrabutyl ammonium hydroxide, Bu₄NOH (40% w/v in water) and chrysene (Chry) from Aldrich (Steinheim, Germany), benz[*a*]anthracene (BaA) and benzo[*a*]pyrene (BaP) from Fluka (Buchs, Switzerland), HPLC-grade methanol and acetonitrile from Panreac (Castellar del Vallès, Spain) and ultra-high-quality water from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Benzo[*b*]fluorantene (BbF) was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) as a 10 mg L⁻¹ solution in acetonitrile. Stock solutions of 10 mg L⁻¹ in acetonitrile were also prepared for the rest of target PAHs. These solutions were stored in amber flasks at 4°C.

[23] Ballesteros-Gómez, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S. *Anal.Chim. Acta*, 677(2010)108

2.2. Apparatus

The liquid chromatographic system used consisted of a Waters System (Milford, MA, USA) furnished with a 1525 binary pump, a column thermostatic oven, a 717 auto-sampler and a 2475-multiwavelength fluorimetric detector. The stationary-phase column was a Supelcosil®-LC PAHs (octadecyl siloxane) column (5µm, 100 mm x 3 mm) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). A homogenizer-disperser Ultraturrax T25 Basic from IKA (Staufen, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment (Ref. 549-01000-00) for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL (Ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warszawa, Poland) were used for sample preparation. The rate of the vortex-shaker was measured with a PCE-155 laser handheld tachometer supplied by PCE-Ibérica (Tobarra, Spain). The water content of the SUPRAS was determined with a Karl-Fisher titrator coulometer 831KF by Metrohm, (Herisau, Switzerland).

2.3. Supramolecular solvent production

The following procedure, which permits to obtain a SUPRAS volume (~ 6 mL) able to treat 30 food samples, was routinely followed. Octanoic acid (5 g) was mixed with Bu₄NOH, 40% (11.25 mL) and distilled water (40 mL) in a 100 mL glass centrifuge tube. The mixture was centrifuged for 5 min at 3000 rpm (2000 g). The SUPRAS formed was less dense than water and was separated as a new liquid phase at the top of the solution. Then, it was withdrawn with a syringe and stored in a closed glass vial until use. Under these conditions, it was stable at room temperature for at least one month. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant octanoic acid/ Bu₄NOH/water proportion.

2.4. Determination of PAH4 in food

2.4.1 Sample pretreatment

Different food samples were randomly purchased in local markets, namely, smoked fish (cod and salmon), smoked meat (pork loin and turkey), boiled mussels and processed cereal-based food for infants. Samples were chopped and

homogenized using a homogenizer-disperser. Then, sample aliquots of about 1 g were stored in plastic bags at -20°C until analysis. After thawing, portions of about 200 mg were taken for analysis and recovery experiments, which were performed in triplicate. Spiking of samples was made by adding a minute volume (20 μL) of a solution containing the four target PAHs (0.1 mg L^{-1} each) in acetonitrile. Spiked samples were allowed to stand at room temperature for around 12 h before analysis.

2.4.2. Microextraction of PAH4

About 200 mg of food sample and 200 μL of SUPRAS were mixed in a Safe-Lock 2-mL microtube from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). Four glass-pearls (3 mm of diameter) were introduced in the microtube to favor sample dispersion during extraction, which was made by vortex-shaken at 2500 rpm for 10 min. Then, the mixture was centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes at room temperature. Finally, the SUPRAS containing the target PAHs was transferred to a glass vial from which 10 μL were injected into the chromatographic system.

2.4.3. Quantification of PAH4 by LC-fluorescence detection

The target PAHs were separated and quantified by using LC with fluorescence detection. The mobile phase consisted of water:methanol 20:80 (v/v) (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.65 mL min^{-1} . The column temperature was set at 35 °C. The gradient elution program used was 30 % B during the first 5 minutes and ramp from 30% to 80% B over the next 15 min. The reconditioning of the column took about 15 min. The fluorescence detection program was performed at the following excitation and emission wavelengths: BaA and Chry (λ_{ex} 275 nm, λ_{em} 385 nm), BbF (λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 438 nm) and BaP (λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 405 nm). Calibration curves for PAHs, in the concentration ranges specified in Table 3, were prepared by mixing 10 μL of acetonitrile solutions containing the PAHs at different concentrations with 100 μL of SUPRAS.

3. Results and discussion

3.1 Microextraction of PAH4

3.1.1. Synthesis, composition and binding capability of the vesicular SUPRAS

Equimolecular aqueous mixtures of protonated and deprotonated alkylcarboxylic acids produce vesicles that self-assemble in the presence of tetrabutylammonium to give oily droplets (i.e. coacervate droplets) that flocculate through the formation of conglomerates of individual droplets. The overall density of such conglomerates is slightly lower than that of the solution in which they form, which facilitates creaming and phase separation (SUPRAS) from the bulk solution (Fig. 1A).

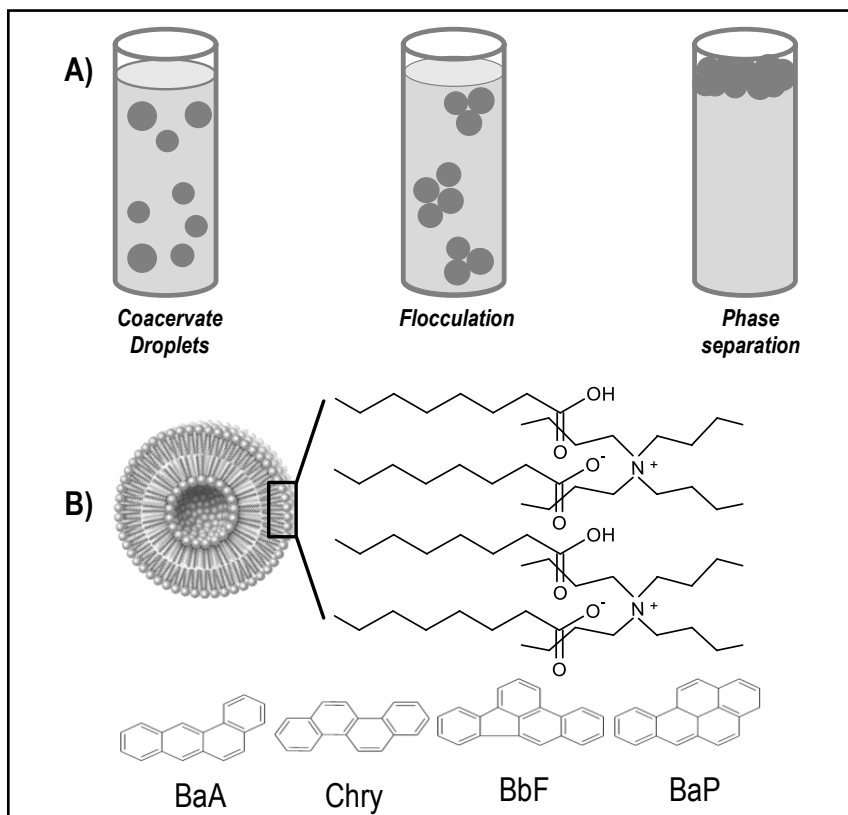


Figure 1: Schematics of A) SUPRAS formation in the bulk solution and B) SUPRAS composition and structure of the target PAHs

Synthesis of vesicular SUPRASs is a spontaneous and fast process involving the mixture of an alkylcarboxylic acid (chain length higher than five carbons) and Bu₄NOH, at an acid/base molar ratio of 2, in an aqueous solution⁽²¹⁾. Hydroxide ions neutralize a half of the alkylcarboxylic acid molecules, this permitting the formation of aqueous vesicles, and B₄N⁺ ions induce the coacervation by reducing the repulsion of carboxylate groups in the vesicle. The volume of solvent produced is linearly dependent on the amount of alkylcarboxylic acid used in the synthesis and the SUPRAS consists of equimolecular amounts of alkylcarboxylic acid, alkylcarboxylate and B₄N⁺ arranged in a supramolecular structure dispersed in water.

Figure 1B shows a picture of the aggregates making up the SUPRAS and the structure of the target PAHs. Two types of interactions were expected to be the driving forces for extraction, namely; (1) dispersion forces between the hydrocarbon chains of the amphiphile and the analytes, and (2) π -cation interactions between the aromatic rings of analytes and the quaternary nitrogen of tetrabutyl ammonium. Both types of interactions should provide a good solubilization of PAHs in the SUPRAS that facilitating their efficient extraction.

3.1.2. Optimization

The selection of the alkylcarboxylic acid making up the SUPRAS intended to extract PAH4 was based on criteria such as extraction efficiency and no interference in the chromatographic resolution of analytes. Three alkylcarboxylic acids, namely octanoic, decanoic and dodecanoic acids were tested for this purpose. Extraction efficiency for the target compounds was similar in the three types of SUPRAS whereas optimal chromatographic resolution was obtained in octanoic acid-based SUPRASs since its greater polarity prevented the octanoic acid in the extracts from coeluting with the target PAHs. The volume of SUPRAS produced was linearly dependent on the amount of octanoic acid used for its synthesis. The slope of the straight line obtained by plotting V_s as a function of octanoic acid was $1.18 \pm 0.02 \mu\text{L mg}^{-1}$. The water content for this SUPRAS was $6.1 \pm 0.1\%$.

The effect of experimental variables on the efficiency of extraction of PAH4 from food was investigated by extracting mussel samples, which were selected as models for optimization studies on the basis of its representative protein, carbohydrate and fat content (see the footnote in Table 4). Mussel samples (200 mg)

containing no PAH4 at detectable concentration levels were fortified with $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of each target PAH and analyzed. It was checked that the time of contact between the spike and the sample before its extraction did not influence the recovery in the interval tested (12-48 h), so 12 h was the time permitted for PAH-sample interaction before analysis. The results were calculated as a mean of triplicate measurements. Selection of optimal conditions for extraction was based on the recoveries obtained for the target PAHs. The variable investigated were the volume of extractant, sample amount, time required to reach equilibrium conditions and stirring rate. The representativity of the subsample selected for analysis was also investigated.

Table 1 show the effect of varying the volume of SUPRAS on the extraction efficiency for PAHs in mussels. Quantitative recoveries were obtained for solvent volume (μL)/sample amount (mg) ratios greater than or equal to 1. A volume of 200 μL of SUPRAS was selected in order to get the lowest possible quantification limits for PAHs.

Table 1: Mean recoveries^a and standard deviations (n=3) obtained for PAHs as a function of the volume of SUPRAS

SUPRAS volume (μL)	Recovery \pm SD (%)			
	BaA	Chry	BbF	BaP
50	70 \pm 1	75 \pm 2	72 \pm 1	66 \pm 2
100	80 \pm 2	80 \pm 3	82 \pm 3	86 \pm 3
200	98 \pm 3	99 \pm 2	94 \pm 4	98 \pm 4
400	93 \pm 2	99 \pm 3	94 \pm 3	100 \pm 3
800	100 \pm 4	100 \pm 5	95 \pm 4	102 \pm 2

^a 200 mg of mussel spiked with $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of each PAH

Representativity of subsamples was investigated by spiking aliquots of 5 g of mussel samples with $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of each target PAH and then analyzing different sample amounts in the interval 100-800 mg. The solvent volume (μL)/sample amount (mg) ratio was kept constant and equal to 1 in all the experiments. The amount of subsample used for extraction did not affect extraction yield in the selected interval.

The high solubility of PAHs in the SUPRAS facilitated the rapid transfer of analytes from the food sample to the solvent despite their high hydrophobicity (log

K_{ow} in the range 5.91-6.40). Ten min of vortex shaking-assisted extraction (vibration motion = 2500 rpm) were only required to quantitatively extract the target compounds from mussel samples (Table 2). Effective separation of sample particles from SUPRAS was reached after centrifugation at 7000 rpm for 10 minutes.

Table 2: Mean recoveries^a and standard deviations (n=3) obtained for PAHs as function of extraction time

Extraction time (min)	Recoveries ± SD (%)			
	BaA	Chry	BbFA	BaP
1	58±2	82±3	69±2	74±2
5	72±2	93±4	80±3	86±3
10	98±3	99±4	94±5	98±3
15	99±3	98±3	98±3	98±4
20	101±3	102±4	98±3	100±2

^a 200 mg of mussel sample spiked with 10 µg kg⁻¹ of each PAH; volume of SUPRAS = 200 µL; vibration motion = 2500 rpm

3.2. Analytical performance

Calibration curves were run by injecting variable concentrations of BaA, Chry, BbF and BaP in acetonitrile(9.1%)-SUPRAS since BbF was obtained as a stock solution in acetonitrile (see Section 2.1). Analytes in samples were analyzed in pure SUPRAS. No differences in retention times or peak areas were observed for analytes injected in both types of solutions.

Calibration parameters and detection (MDLs) and quantitation (QMLs) limits for the determination of PAHs by the proposed method are shown in Table 3. The linear range was confirmed by the visual inspection of the plot residuals versus analyte amount; the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained. The MDLs were calculated from six independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.4) of mussel, salmon, pork loin, and cereal-based food for infant samples, containing no detectable levels of PAHs, by using a signal-to-noise ratio of 3 (the ratio between the peak areas for each target analyte and peak area of noise). The

MQLs were calculated in a similar way by using a signal-to-noise ratio of 10. Very small differences were observed between the MDLs and MQLs achieved for the determination of a given PAH in the different matrices assayed and MQLs lower than $0.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ (below the current MRL established for BaP in different types of food, namely $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ for smoked fish and meat, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for mussel and $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ for infant food) were obtained for all the analytes determined.

Table 3. Analytical figures of merit of the proposed method

PAH	Calibration parameters				MDL ^c ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	MQL ^d ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
	Linear angle ^a $\times 10^2$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Slope \pm SD $\times 10^2$ ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	Intercept \pm SD $\times 10^2$	r^b		
BaA	0.4-100	1786 ± 7	72 ± 69	0.99998	0.1-0.2	0.4-0.5
Chry	0.6-100	711 ± 8	34 ± 37	0.9995	0.1-0.2	0.6-0.7
BbF	0.6-100	703 ± 1	68 ± 67	0.9995	0.1-0.2	0.6-0.7
BaP	0.3-100	2629 ± 9	187 ± 166	0.9997	0.1-0.2	0.3-0.4

^a Instrumental quantitation limit calculated by using a signal-to-noise ratio of 10

^b Correlation coefficient

^c Method detection limit

^d Method quantitation limit

The possible interference of matrix components that could coelute with PAHs was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves ($n = 7$) obtained from standards in acetonitrile (9.1%)-SUPRAS with those obtained from real samples (mussel, salmon, pork loin, and cereal-based food for infant) fortified with known amounts of PAHs and run using the whole recommended procedure (see Section 2.4). No statistically significant differences between these slopes were observed by applying a Student's test⁽²⁴⁾. The experimental t -values obtained (1.33-2.50) were below the critical t -value (3.17), being significance established at 0.01 level.

The precision of the method was evaluated by analyzing eleven aliquots of a mussel blank sample spiked with $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of PAHs. The relative standard deviations for the different PAHs were in the interval 2.6-3.3%.

3.3. Analysis of foodstuffs

The suitability of the proposed method for the determination of PAH4 in food was assessed by analyzing non-fortified and fortified samples belonging to different food categories for which maximum levels of BaP have been set in EC Regulation⁽⁴⁾, namely smoked meat and fish, bivalve mollusks, and processed cereal-based food for infants. The concentration of PAHs at which samples were spiked matched the maximum level set for BaP in each type of foodstuff. Experiments were made in triplicate.

Table 4 shows the results obtained expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. The information on the content of fat, proteins and carbohydrates specified in the packing level of the samples is also included. Only BaP in the mussel sample was found at a concentration above the method quantitation limit. BaP was also the PAH more frequently detected in the other samples analyzed (estimated concentrations for values below MQLs are included in the table). BaA was also detected in salmon. All the concentrations found for PAHs were far below the maximum level set for BaP in EC Regulation. The recoveries obtained from the analysis of fortified samples ranged from 92 to 103% with relative standard deviations from 2 to 5%.

[24] Cuadros, L.; García, A.M.; Alés, F.; Jiménez, C.; Román, M. *J. AOAC Int.* 78(1995) 471

Table 4. Mean concentrations \pm SD ($n=3$) of PAH4 in food samples, and recoveries \pm SD ($n=3$) obtained after spiking the samples with BaA, Chry, BbF and BaP at different concentration levels

Foodstuff	Concentration found ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) and recoveries (%)			
	BaA	Chry	BbF	BaP
^a Mussel	n.d. 93 \pm 4	n.d. 92 \pm 3	n.d. 101 \pm 3	0.79 \pm 0.02 101 \pm 4
^b Turkey	n.d. 92 \pm 4	n.d. 97 \pm 2	n.d. 100 \pm 3	Detected (\sim 0.17 \pm 0.01) 92 \pm 2
^c Loin Pork	n.d. 95 \pm 3	n.d. 96 \pm 4	n.d. 103 \pm 5	Detected (\sim 0.14 \pm 0.01) 102 \pm 4
^d Salmon	Detected (\sim 0.23 \pm 0.01) 97 \pm 3	n.d. 89 \pm 5	n.d. 98 \pm 2	n.d. 97 \pm 3
^e Cod	n.d. 100 \pm 2	n.d. 98 \pm 3	n.d. 99 \pm 5	Detected (\sim 0.11 \pm 0.01) 100 \pm 4
^f Cereal-based food for infant	n.d. 96 \pm 3	n.d. 99 \pm 4	n.d. 99 \pm 3	n.d. 96 \pm 2

Nutritional composition: (g/100g food)

^a Fat: 2.7, protein: 18.45, carbohydrate: 3.18

^b Fat: 2, protein: 14, carbohydrate: 7

^c Fat: 7.5, protein: 18.5, carbohydrate: 0.79

^d Fat: 12.1, protein: 22.1, carbohydrate: <1

^e Fat: 0.3, protein: 17.3, carbohydrate: <1

^f Fat: 2.9, protein: 2.5, carbohydrate: 12.4

Spiking level:

^a 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

^{b,c,d,e} 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

^f 1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

n.d. = non detected

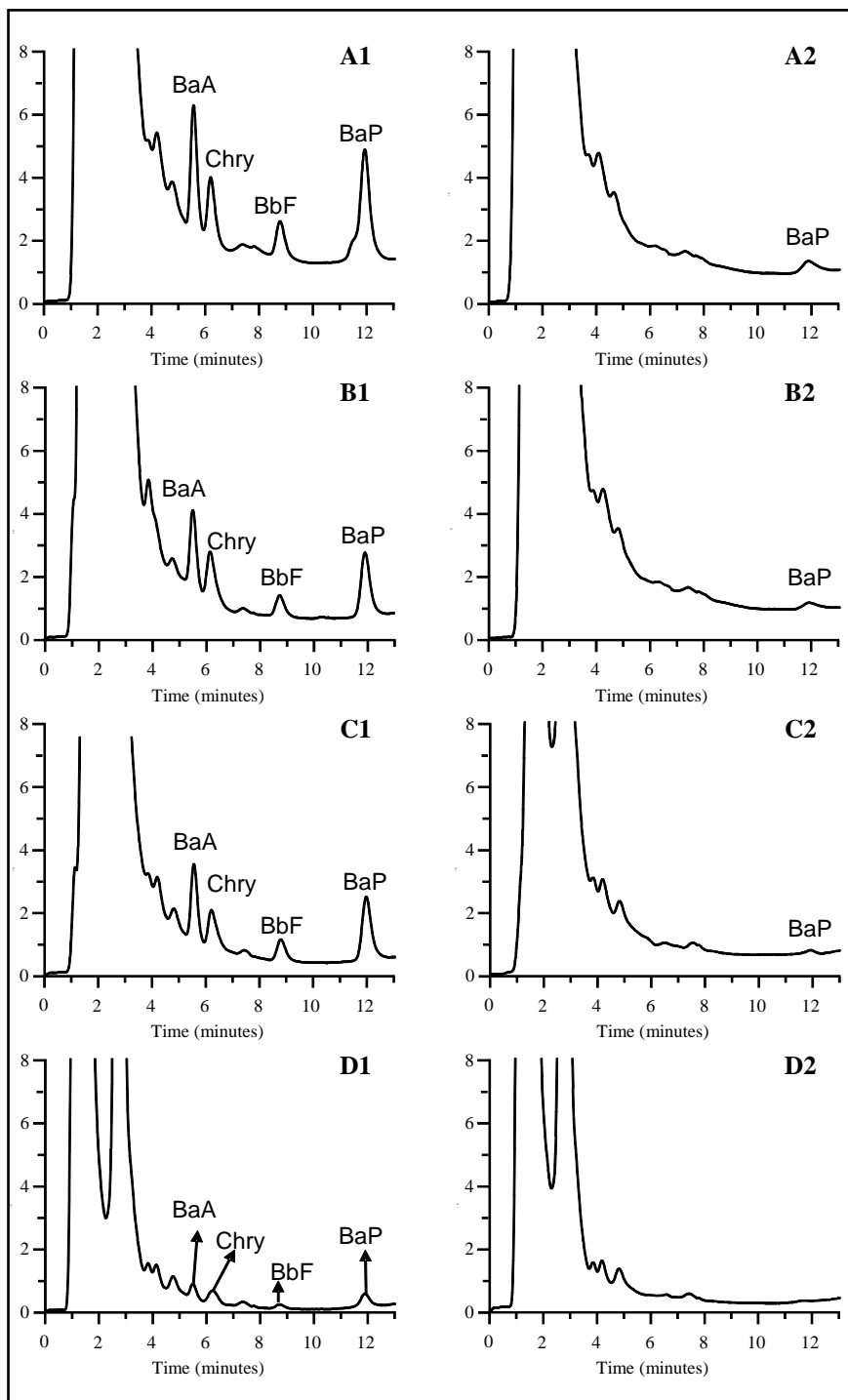


Figure 2: Chromatograms obtained from the analysis of 1) spiked and 2) non-spiked samples of A) mussel, B) turkey, C) cod and D) cereal-based food for infant.

Figure 2 shows representative chromatograms obtained from non-fortified and fortified samples. The profile of the chromatograms was very similar for all the types of foodstuff analyzed. Contrary to most analytical methods, the proposed method was well suited to both low- and high-fat matrices; the fat content of the samples analyzed ranged from 0.3 to 12.1%. Identification of PAH4 was based on their retention times. Differences between the retention times measured for the analytes from standards and samples were lower than 0.5% in all the cases, and the repeatability obtained for consecutive measurements of this parameter from samples, expressed as relative standard deviations ($n = 6$) were 0.36%, 0.29%, 0.35% and 0.49% for BaA, Chry, BbF and BaP, respectively.

4. Conclusions

A quick and inexpensive sample treatment, based on a single-step microextraction with a SUPRAS made up of vesicles of octanoic acid, has been developed for the determination of PAH4 in foodstuffs belonging to different categories (smoked meat and fish, bivalve mollusks, and processed cereal-based food for infants) and featuring fat (0.3-12.1%), protein (2.5-18.5%) and carbohydrate (<1-12.4%) contents in a wide range. The two structure-derived extraction properties of SUPRAS, namely different polarity regions, able to provide several types of interactions, and high number of binding sites, render SUPRAS excellent candidates to consider them as general extractants in food analysis.

Valuable assets of the matrix-independent sample treatment here developed are: it takes about 20 min and several samples can be simultaneously treated; it requires a low sample amount (0.2 g), which is made representative of the bulk by homogenization, and a low eco-friendly SUPRAS volume (200 μ L); it features low cost and conventional equipment in labs is used. The method can be used for the routine control of PAH4 in food below the tolerance level permitted by the EU directives for BaP.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusia Government (Junta de Andalucía, Spain, project P09-FQM-5151). FEDER also provided additional funding.

PARTE II

CAPÍTULO 6

**Single-drop coacervative
microextraction of organic
compounds prior to liquid
chromatography:
Theoretical and practical
considerations**

Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography: Theoretical and practical considerations

Journal of Chromatography A 1195 (2008) 25-33

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

Abstract

Coacervates made of surfactant aggregates, namely aqueous and reverse micelles and vesicles, were firstly used as solvents in single-drop microextraction (SDME) and proposed for the extraction and concentration of chlorophenols prior to liquid chromatography. The formation of coacervate drops in the needle tip of conventional microsyringes depended on the type of intermolecular forces established between the surfactant headgroups making up the supramolecular aggregates; hydrogen bond interactions were strong enough to permit the formation of spherical drops. Stability of 1–50 μL coacervate drops was achieved by introducing the microsyringe needle tip in a PTFE rod, the end of which had been machined out with a heated flanging-tool to get circular flanges (diameters in the range 3.5–6 mm). The parameters affecting the efficiency of single-drop coacervative microextraction (SDCME) were investigated using vesicular coacervates as a solvent and 2-chlorophenol (CP), 2,4-dichlorophenol (DCP), 2,4,6-trichlorophenol (TCP) and pentachlorophenol (PCP) as model analytes. Coacervative microextraction dynamics fit to the general rate equation of liquid–liquid extraction. The effect of variables such as extraction time, drop volume, stirring rate, pH and temperature, on the extraction of chlorophenols was similar to that described for organic solvent drops. Electrolyte concentrations above 0.1 M

caused drop instability. Under the optimum conditions, detection limits were in the range 0.1–0.3 g L⁻¹. The relative standard deviation was between 4.3 and 5.6 at 20 g L⁻¹ spiked level. The method was applied to the determination of the four chlorophenols in wastewater, superficial water from a reservoir and groundwater and the recoveries were in the range 79 and 106% at 5–20 g L⁻¹ spiked level.

1. Introduction

The world of analytical chemistry increasingly involves smaller scales and miniature devices. In this context, microextraction techniques are the result of looking for the miniaturization of classical extraction techniques in order to expend minimum analysis time and chemicals.⁽¹⁾ In recent years, efforts have been made towards the miniaturization of the traditional liquid–liquid extraction. These “micro-techniques”, based on the contact between two immiscible liquids, fall into two categories,⁽²⁾ namely microextractions using immiscible liquid films⁽³⁻⁵⁾ and single-drop microextraction (SDME).⁽⁴⁻⁸⁾

The most extended drop-based configuration in SDME consists of an organic solvent drop hanging from the tip of a GC syringe needle, immersed in an aqueous sample or exposed to headspace.^(4,9) SDME is a simple, inexpensive, fast, effective and virtually solvent-free sample pre-treatment technique.⁽¹⁾ In combination with GC, it has successfully been used to extract and concentrate a variety of organic compounds from environmental,⁽¹⁰⁻¹⁷⁾ food ^(10,18) and

[1] W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiesnik, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 275

[2] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.

[3] M.H. Ma, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3912.

[4] Y. He, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634.

[5] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565

[6] H.H. Liu, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817

[7] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236.

[8] H.H. Liu, P.K. Dasgupta, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 468

[9] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2935

[10] Q. Xiao, B. Hu, C.H. Yu, L.B. Xia, Z.C. Jiang, *Talanta* 69 (2006) 848

[11] F. Ahmadi, Y. Assadi, S. Hosseini, M. Rezaee, *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 307.

[12] M. Saraji, M. Bakhshi, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 30

[13] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 211

[14] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 17

[15] M.C. Lopez-Blanco, S. Blanco-Cid, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 245

[16] L.S. de Jager, A.R.J. Andrews, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 97

[17] D.A. Lambropoulou, E. Psillakis, T.A. Albanis, N. Kalogerakis, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 205.

[18] R. Batlle, C. Nerin, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 29.

biological^(16,19) samples. However, the applicability of SDME to LC has been restricted because the solvents commonly used in SDME, e.g. toluene, hexane, isooctane, carbon tetrachloride, etc., are not compatible with the reversed phase mode and, besides, the low drop volume used (typically 1 μL) causes low sensitivity in LC analysis.

Different strategies have been developed to surpass the above drawbacks. The compatibility of SDME with LC can be achieved using single-drop liquid–liquid–liquid microextraction (SD-LLLME),⁽²⁰⁾ which involves the use of three phases, namely the donor (sample), organic and aqueous acceptor phases. Another alternative is to use ionic liquids as solvents;⁽²¹⁻²³⁾ they are LC-compatible, water immiscible and non-volatile, thus allowing the application of longer sampling times in headspace SDME. In order to increase the drop volume permitted for extraction, different modifications of the needle tip have been proposed, all of them based on increasing the contact area with the drop.⁽²¹⁻²³⁾ Recently, a bell-mouthed device has been described that permits the use of 20 μL drops without their dislodgement from the needle.⁽²⁴⁾

In this work, coacervates are proposed, for the first time, as solvents in SDME. Coacervates are colloid-rich liquids that separate from colloidal solutions under the action of a dehydrating agent, namely temperature, pH, electrolyte or a non-solvent for the macromolecule.⁽²⁵⁾ The coacervate phase is immiscible with the colloid-poor aqueous equilibrium solution from which it separates. Coacervates based on supramolecular assemblies (e.g. surfactant micelles) have been largely used to extract and concentrate a variety of organic compounds prior to their separation by LC. The extraction technique, initially reported by Watanabe and co-workers,⁽²⁶⁾ has been extensively reviewed.⁽²⁷⁻³²⁾

[19] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H.G. Uglund, T. Gronhaug, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 3

[20] Y. He, Y.J. Kang, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 35

[21] J. Liu, G.B. Jiang, Y.G. Chi, Y.Q. Cai, Q.X. Zhou, J.T. Hu, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870.

[22] J.F. Peng, J.F. Liu, G.B. Jiang, C. Tai, M.J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 3

[23] L. Vidal, E. Psillakis, C.E. Domini, N. Grane, F. Marken, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 189

[24] C.L. Ye, Q.X. Zhou, X.M. Wang, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 7

[25] B. Gander, M.J. Blanco-Prieto, C. Thomasin, C. Wandrey, D. Hunkeler, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 2002

[26] H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 26 (1977) 252

[27] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133

[28] E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Surfactants in Analytical Chemistry—Applications of Organized Amphiphilic*, Elsevier, New York, 1996.

[29] R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Perez-Pavon, C. Garcia-Pinto, E.F. Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251

Coacervates have unique properties to be adopted as solvents in SDME prior to LC. Thus, these liquids are water immiscible, despite water is a major component of coacervates (about 85%). This property has been explained on the basis of their sponge structure.⁽³³⁾ The macromolecules are arranged into a porous network composed of highly interconnected planar bilayers and although the network contains a huge amount of water, the bilayer walls prevent this water from comixing with the bulk water. Secondly, coacervates are compatible with LC mobile phases. In fact, main applications of conventional coacervative extractions have involved this chromatographic technique. However, the main asset of coacervates is the special structure of the macromolecules making them up. Thus, supramolecular assembly-based coacervates are formed by aggregation of amphiphiles, which provide regions of different polarities that have the potential of solubilizing solutes in a wide range of polarity/charge. Hydrophobic solutes are solubilized into the hydrocarbon region, polar/charged analytes can be solubilized in the polar region through a number of interactions (e.g. electrostatic, π -cation, hydrogen bonds, etc.), and amphiphilic solutes are incorporated to the macromolecules through both hydrophobic and polar interactions and form mixed aggregates. This property makes coacervates extremely versatile extractants.

This paper explores the potential of coacervates for SDME and for this purpose studies both the physical characteristics of 5–50 μ L drops and the parameters affecting their extraction efficiency. Different experiments were carried out to determine how the formation and stability of coacervate pendent drops are influenced by the special properties of these liquids. Coacervates made of aqueous micelles, reverse micelles and vesicles were tested for this purpose. Variables influencing the efficiency of single-drop coacervative microextraction were determined using vesicular coacervate drops (10–30 μ L), which were selected as a model. Their suitability to extract polar organic compounds was assessed using chlorophenols as model analytes. The effect of matrix components on this microextraction technique was studied by extracting chlorophenols from different environmental water samples. Below, the main results are outlined.

[30] S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470

[31] F. Merino, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1613.

[32] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, M.I. Karayannis, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 426.

[33] F.M. Menger, A.V. Peresyepkin, K.L. Caran, R.P. Apkarian, *Langmuir* 16 (2000) 9113

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid, Triton X-114 and sodium dodecyl sulfonic acid were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), tetrabutyl ammonium hydroxide (Bu_4NOH) and pentachlorophenol (PCP) from Aldrich (Steinheim, Germany), 2,4,6-trichlorophenol (TCP), sodium chloride, octanoic acid, Brij 52 and Brij 30 from Sigma (St. Louis, MO, USA), Triton X-100 from Serva (Heidelberg, Germany), ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA), 2-chlorophenol (CP) and 2,4-dichlorophenol (DCP) from Merck (Darmstadt, Germany) and acetonitrile, tetrahydrofuran and hydrochloric acid from Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Ultra high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

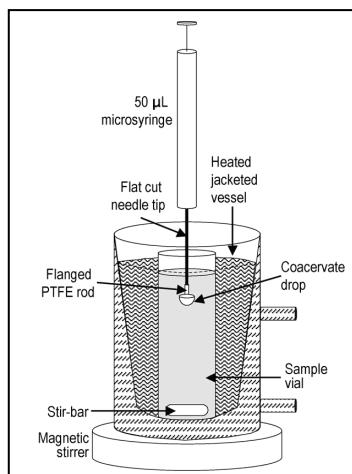


Figure 1: Schematic illustration of the system used for coacervative microextraction

2.2. Apparatus

The microextraction apparatus (Figure 1) consisted of a microsyringe, a PTFE rod, a vial, a stir bar, a magnetic stirrer and a jacketed vessel thermostated by means of circulating water bath. The 50- μL microsyringe, with a flat-cut tip fixed needle (glass barrel I.D.: 1.03 mm, needle I.D.: 22 gauges/0.644 mm), was supplied by SGE Analytical Science (Victoria, Australia). The syringe needle tip was

introduced in a 0.5-mm I.D. PTFE rod, the end of which had been machined out with a heated flanging-tool to get circular flanges (diameters in the range 3.5–6 mm). The 20-mL glass vials (60 mm high × 20 mm I.D.) were supplied by Supelco (Madrid, Spain). Cylindrical PTFE-coated stir bars (15 mm long × 4.4 mm diameter) were purchased from Pobel (Madrid, Spain). Their speed was measured using a PCE-155 laser handheld tachometer supplied by PCE-Ibérica (Tobarra, Spain). The jacketed vessel was supplied by Metrohm (Herisau, Switzerland) and the thermostated bath (temperature uncertainty $\pm 0.1^\circ\text{C}$) was supplied by Neslab (model RTE-9, Newington, USA). A Thermo/Finningan (Bellefonte, PA, USA) liquid chromatograph (P4000 quaternary pump and UV6000LP photodiode array detector) was used for quantification. Injection of coacervate drops into de chromatographic system was carried out using a Rheodyne (Rohnert Park, CA, USA) six-port manual sample injector provided with a 50- μL sample loop. The analytical column (Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain) was a 15-mm long Hypersil octadecyl siloxane (4.6 mm I.D., 5 μm particle diameter).

2.3. Vesicular coacervate formation

Vesicular coacervates were obtained by mixing decanoic acid and tetrabutyl ammonium hydroxide, at a 2:1 molar ratio, in distilled water at pH 7. Complete dissolution of decanoic acid and liquid–liquid-phase separation was obtained by centrifugation of the mixture for 5 min at 3000 rpm ($2000 \times g$). The coacervate, which was standing at the top of the solution, was withdrawn with a syringe and stored in a closed glass vial until use. It was stable at room temperature for at least 1 month. The amount of decanoic acid used depended on the coacervate volume required (the slope of the linear relationship between the volume of coacervate and the amount of decanoic acid was $1.3 \pm 0.2 \text{ L/mg}$). Typically, about 1.3 mL of coacervate was prepared from 1.03 g of decanoic acid, 0.78 g of tetrabutyl ammonium hydroxide and 40 mL of distilled water.

2.4. Determination of chlorophenols in environmental water samples

2.4.1. Sample collection

The wastewater influent sample was collected from the municipal wastewater treatment plant (WWTP) of Bailén, in the south of Spain. Bailén WWTP

receives $\approx 60\%$ industrial effluents (mainly from built industries) mixed with domestic wastewater. Superficial water was collected in the reservoir La Breña, in Córdoba province (Spain), whereas groundwater samples were taken in Jaén province (Spain). Samples were collected into dark glass bottles. They were immediately filtered through $0.45\ \mu\text{m}$ nylon membrane filters (Millipore) in order to remove suspended solids, and then they were adjusted to pH 2 by the addition of hydrochloric acid. Finally, they were stored at $4^\circ\ \text{C}$.

2.4.2. Extraction procedure

Samples (20 mL) were treated with EDTA ($1.5\ \text{g L}^{-1}$), adjusted to pH 5 with sodium hydroxide and heated to $40^\circ\ \text{C}$ (Figure 1). The preparation of suspended coacervate drops in the microsyringe needle tip required different operations. First, the microsyringe was flushed once with $30\ \mu\text{L}$ of coacervate solution, drawing the plunger up and depressing it slowly, in order to remove all the air and prevent the formation of bubbles. After that, $30\ \mu\text{L}$ of coacervate was drawn slowly into the syringe. Next, the needle was cleaned with a tissue and introduced into a flanged PTFE rod (the diameter of the circular flange was 3.5 mm). The syringe was then fixed with a metal stand and clamps, the needle was immersed into the vial solution at a distance from the bottom of 4.5 cm and the plunger was totally depressed to generate the coacervate drop on the needle tip. Extraction of chlorophenols was carried out by stirring at 300 rpm for 1 h. After finishing the extraction, the drop was retracted and the syringe taken out from the sample vial. The needle tip was then cleaned carefully with a tissue, and the coacervate drop injected into the LC system. In order to avoid carryover of analyte to the next extraction, the syringe was rinsed four to five times with acetone to completely remove the coacervate film remaining in the needle after injection.

2.4.3. Liquid chromatography analysis

Separation of CP, DCP, TCP and PCP was performed using a mobile phase consisting of 1% acetic acid and methanol. The gradient elution program was isocratic with 30% methanol for 16 min and then to 100% methanol in 24 min. The column effluent was monitored at 276 nm for CP, 288 nm for DCP and TCP and 304 nm for PCP.

3. Results and discussion

3.1. Formation and stability of coacervate drops in a syringe needle tip: theoretical and practical considerations

The formation of stable coacervate drops in the needle tip of a microsyringe, introduced in an aqueous sample solution, depends on both general and specific liquid drop formation conditions being fulfilled. General conditions establish that a water immiscible coacervate drop is impacted by three forces: the upward floating force ($F_f = V_c \gamma_{\text{wat}}$) (γ = density); the downward gravity force ($F_g = V_c \gamma_c$) and the adhesion force, which results from surface tension (σ) and is constant under experimental conditions. Coacervate drops should adhere to the needle tip until their volume, V_c , reaches a point where the surface tension can no longer bind them to the tip. Then, they should fall or move upward depending on the relative values of γ_{wat} and γ_c . On the other hand, coacervates feature some properties that will undoubtedly influence drop formation. Thus, they are made up of surfactants, which are known to reduce the surface tension significantly. For example, the surface tension for water–air and water–heptanoic acid interfaces is 72.94 and 7.0 dyn cm⁻¹, respectively.⁽³⁴⁾ Besides, the phenomenon is reversible; so, it is reasonable to think that the coacervating conditions (e.g. temperature, pH, salt concentration, etc.) should be kept in the sample solution during extraction to prevent coacervate drop solubilization.

Preliminary experiments were conducted by suspending a variety of coacervate drops, made up of different surfactant aggregates (i.e. non-ionic micelles from Triton X-114, Triton X-100, Brij 30 and Brij 52,⁽²⁷⁾ dodecyl sulfate anionic micelles,⁽³⁵⁾ octanoic acid reverse micelles⁽³⁶⁾ and decanoic acid vesicles⁽³⁷⁾ from both angled- and flat-cut needle tips of microsyringes immersed in distilled water (10–40 mL)). Static conditions were held. Water immiscibility of coacervate drops was guaranteed by maintaining the coacervating conditions in the sample solution (i.e. the temperature was fixed at 30, 70, 20 and 30°C in experiments involving Triton X-114, Triton X-100, Brij 30 and Brij 52, respectively, and the solution was made 4 M HCl and 4% THF in experiments involving coacervates made from dodecyl sulfate

[34] A.W. Adamson, A.P. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces*, Wiley, New York, 1997.

[35] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519

[36] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473

[37] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229

and octanoic acid, respectively). It was found that decanoic acid vesicular coacervate drops were water immiscible in the absence of the coacervating agent (i.e. tetrabutyl ammonium) in the sample solution. All the experiments were running by adding the corresponding surfactant, at concentrations near the critical aggregation concentration, to the sample solution, since it is known that coacervates are in equilibrium with the surfactant monomers dissolved in the solution from which they separate.⁽²⁷⁾ Drop volumes between 1 and 50 μL were tested to cover the range of interest for LC.

It was found that coacervates behaved in two different ways with respect to drop formation. Coacervates made from non-ionic and anionic aqueous micelles did not form spherical drops under any of the experimental conditions investigated; the cohesive forces of the surface layer were not high enough and the drop was slowly broken up into bits of an undefined shape that moved upward or downward from the tip outlet, depending on the relative values of γ_{wat} and γ_c . These coacervates were water immiscible and spread on the surface or remained in the bottom of the aqueous solution. On the other hand, coacervates made from reverse micelles and vesicles of octanoic and decanoic acid, respectively, formed spherical drops, although drop sizes as low as 1 μL moved upward from the tip outlet until they reached the top of the solution (the density of both alkyl carboxylic acid reverse micelle and vesicle coacervates is lower than that of water). At the surface, coacervate drops adopted a hemispherical shape.

The different behaviour found for coacervates with respect to drop formation was the result of the different intermolecular forces involved in the aggregates. Hydrophobic interactions between the surfactant hydrocarbon chains, which are responsible for aggregation of surfactants, were present in all the aggregates making up the coacervates, but they were not strong enough to form coacervate drops. However, carboxylic acid molecules were strongly hydrogen-bonded to each other and we propose that hydrogen bond intermolecular forces increased the cohesion between molecules strongly and they were responsible for drop formation in the reverse micelle- and vesicle-based coacervates. This hypothesis was confirmed by adding decanoic acid to coacervates made of Triton X-114 at different molar ratios (from 1:10 to 1:1). The cohesion force in the non-ionic coacervate increased, which prevented it to break up into bits. This behaviour opens

the possibility of controlling the shape of coacervates by controlling the intermolecular forces of the surfactant molecules that make them up.

In order to keep coacervate drops (1–50 μL) pendent in the needle tip of the microsyringe, the needle tip was introduced in a PTFE rod,⁽²¹⁻²³⁾ the end of which had been machined out with a heated flanging-tool to get circular flanges (diameters in the range 3.5–6 mm). In this way, the adhesion force increased and the equilibrium between the acting forces on the drop (floating, gravity, cohesion and adhesion) was reached. As a result, coacervate drops remained suspended from the tip. The volume of the drop determined the range of diameters of the PTFE circular surface to be used; the minimum and maximum limit for each volume depended on drop stability and the ability to retract the drop into the microsyringe after extraction, respectively. Typically, the drop shape at the PTFE surface was a hemisphere (Figure 1).

In order to study the suitability of coacervates for single-drop microextraction we selected tetrabutyl ammonium-induced vesicular coacervates made up of equimolecular amounts of decanoic acid and decanoate. This selection was based on experimental convenience (no coacervating conditions were required during extraction) and their ability to establish several types of interactions with organic analytes, namely hydrophobic, electrostatic, π -cation, hydrogen bond and formation of mixed aggregates, which makes them very versatile extractants.⁽³⁷⁾

The stability of vesicular coacervate drops under stirring conditions was investigated since the agitation of samples is essential in single-drop microextractions to reduce the time for thermodynamic equilibrium. Figure 2a shows the maximum stirring rate permitted for drops between 5 and 40 μL placed at different heights from the bottom of glass vials (60 mm high \times 20 mm I.D.) containing a 20-mL sample. The diameter of the PTFE circular surface at the tip of the syringe was 3.5 mm. With the experimental setup proposed, maximal stirring rates between 300 and 600 rpm should be kept during the extraction of samples with drop volumes in the range 40–5 μL , respectively. Faster stirring rates resulted in dislodgement of coacervate drops from the needle tip.

An important factor to consider was the extent of drop dissolution during extraction. In organic solvent-based microextractions, drop loss is mainly dependent

on solvent solubility, stirring rate and extraction time. In coacervates, the aggregates making them up are in equilibrium with free surfactant molecules in the aqueous solution, so some coacervate dissolution was expected to reach this equilibrium. Solubilization of vesicular coacervate drops (20 μL) in both distilled water and the equilibrium solution remaining after the separation of the coacervate (it typically contains the surfactant at concentrations near the critical vesicle concentration and the coacervating agent tetrabutyl ammonium) was investigated. No differences in drop solubility were found at all experiments involving 10 mL of both sample solutions, which were stirred at 300 rpm for 13 h. So, vesicular coacervate drops can be directly immersed in samples for extraction. At the moment, we do not know if this behaviour is singular for vesicular coacervates as a result of the slow monomer dissociation in vesicles, which typically occurs in a time span of hours,⁽³⁸⁾ or is a general rule of coacervates as a consequence of macromolecule interactions, which would prevent or slow down monomer dissociation. Figure 2b shows a typical vesicular coacervate solubilization-time profile. It fit to a second-order exponential decay curve and featured the highest drop loss ($\approx 2 \mu\text{L}$) during the first extraction hour. From this time, only 3 μL were dissolved for extraction times of 12 h. The results obtained for other drop volumes, namely 5, 10 and 30 μL , were similar; about 2–3 μL were dissolved during the first extraction hour. So, similarly to drop microextractions based on organic solvents, solubilization of coacervate drops must be considered for calculation of thermodynamic and kinetic extraction parameters.

3.2. Kinetic considerations

Theory predicts that extraction rate curves for analytes in coacervates should be described by the expression

$$C_c = C_{c,\text{eq}} (1 - e^{-kt}) \quad [1]$$

where $C_{c,\text{eq}}$ is the equilibrium analyte concentration in the coacervate phase and k is the observed rate constant, which is given by

$$k = A_i \beta_0 \left(\frac{K_D}{V_{\text{aq}}} + \frac{1}{V_c} \right) \quad [2]$$

[38] J.H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, New York, 1982.

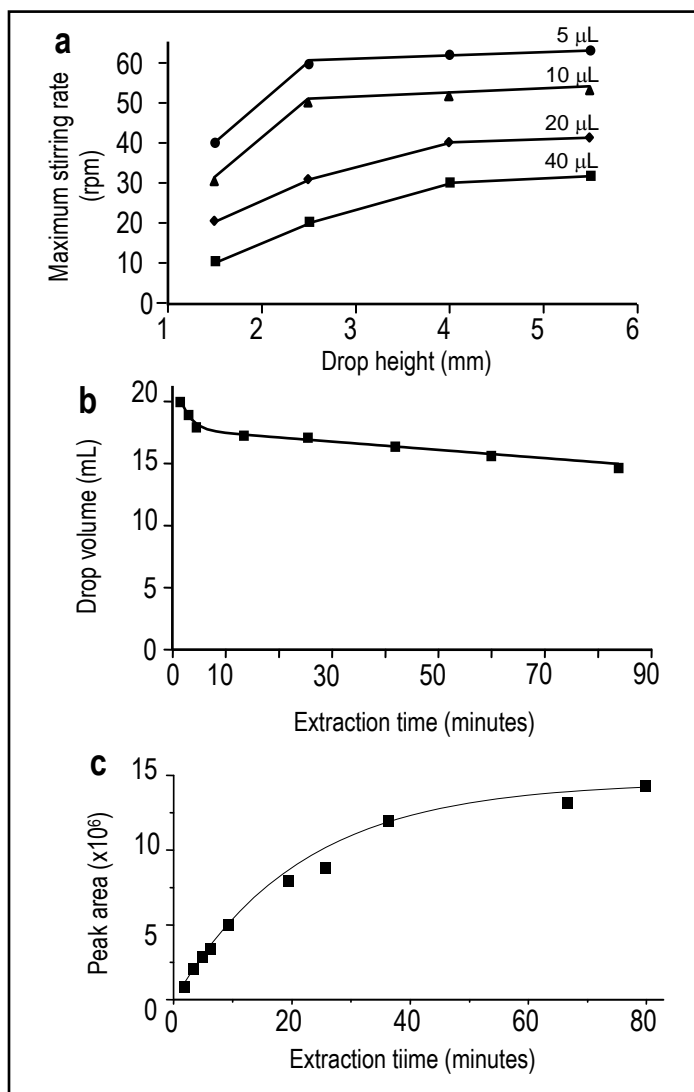


Figure 2: (a) Maximum stirring rate permitted as a function of both the height of the drop from the bottom of the solution vial and the drop volume (sample volume 20 mL). (b) Decreasing of the volume of 20 μL drops immersed in 20 mL of distilled water, stirred at 300 rpm and room temperature, as a function of time. (c) Extraction-time profile for pentachlorophenol by SDCME. Experimental conditions: drop volume: 20 μL ; sample volume: 20 mL; Stirring rate: 300 rpm; room temperature; pH 5; $[\text{PCP}] = 0.5 \text{ mg L}^{-1}$

A_i is the interfacial area between the coacervate and water phases, β_o is the overall mass transfer coefficient with respect to the coacervate phase, K_D is the distribution coefficient (defined by $C_{c,eq} / C_{aq,eq}$), and V_{aq} and V_c are the aqueous and coacervate phase volumes, respectively.

Figure 2c shows a typical extraction-time profile obtained in SDCME. It represents the measured peak areas corresponding to the amount of pentachlorophenol (PCP) extracted into vesicular coacervate drops as a function of the exposure time. At equilibrium, more than 98% of PCP was extracted into the coacervate drop. Data points of PCP concentrations in the coacervate phase as a function of time fit to Eq. [1] very well ($r^2 = 0.993$) as it was determined by using the software package Origin7.0 supplied by OriginLab (Northampton, MA, USA). The calculated value of k under the experimental conditions specified in the caption of Figure 2 was $(4.1 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. So, similarly to SDME, SDCME fit to the general liquid-liquid extraction equations and consequently, fast extractions in SDCME are predicted to require A_i and β_o to be maximized while V_{aq} and V_c be minimized.

3.3. Study of the parameters affecting drop coacervative microextractions

The general parameters expected to influence the extraction of organic compounds by vesicular coacervate drops (i.e. extraction time, drop volume, stirring rate, pH, temperature, ionic strength, etc.) were investigated. Chlorophenols (CP, DCP, TCP and PCP), which can establish a number of interactions with vesicular coacervates namely hydrogen bond, hydrophobic and π -cation (e.g. Figure 3), were selected as analyte models for extraction studies. The reason for this selection was that these compounds were efficiently extracted under conventional extraction procedures,⁽³⁷⁾ so the weight of the different factors on analyte mass transfer from the aqueous solution to the coacervate drop could be investigated. Chromatographic peak areas were used to assess the extraction efficiency under the different experimental conditions tested. Aqueous solutions (20 mL), spiked with a mixture of chlorophenols ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ each), were used throughout the SDCME optimisation experiments.

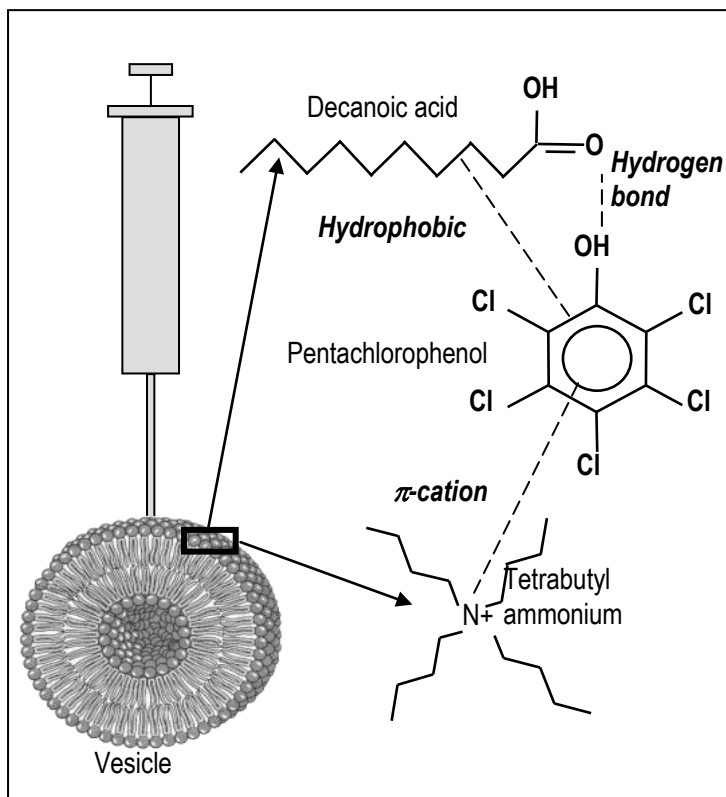


Figure 3: Picture of the intermolecular forces responsible for the extraction of chlorophenol by decanoic acid vesicle-based coacervates

3.3.1. Extraction time

Figure 4a shows that the analytical signal for all the chlorophenols increased quickly with sampling times up to about 30 min and then the rate of increase slowed down, although the equilibrium was not reached after 1 h. The criteria for the selection of the extraction time in our study were based on general rules in SDME: (a) accurate and precise analyses can be obtained under non-equilibrium conditions provided that the stirring rate and measurement time are reproducible,⁽⁴⁾ (b) prolonged extraction times usually result in drop loss, and (c) extraction time is usually matched to the chromatography run, thus allowing maximum sample throughput.⁽¹³⁾ According to these criteria, we selected an extraction time of 60 min

for further studies, which matched the chromatogram run time. The reproducibility in peak areas at this time was investigated on 11 replicate samples containing a mixture of chlorophenols. The relative standard deviation calculated was between about 3 and 4%.

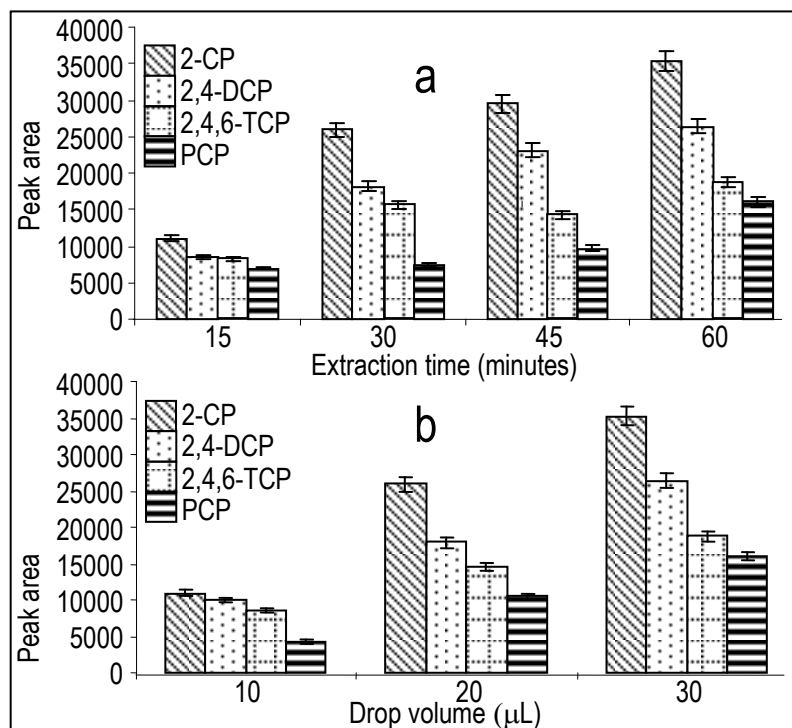


Fig. 4. Effect of (a) the extraction time and (b) the drop volume on the extraction efficiency of SDCME for chlorophenols. Experimental conditions—sample volume: 20 mL; stirring rate: 300 rpm; temperature: 20 °C; pH5; concentration of chlorophenols: 20 µg L⁻¹ each. (a) Drop volume: 30 µL and (b) extraction time: 60 min.

3.3.2. Coacervate drop volume

Coacervate drops between 10 and 40 µL were exposed to an aqueous sample solution, spiked with a mixture of chlorophenols (20 µg L⁻¹ each), for 60 min. Drops higher than 30 µL were not stable enough during extraction and sometimes they dislodged from the needle of the microsyringe. So, they were not considered in further studies. Figure 4b shows that the analytical signal increased linearly with coacervate drop volume in the range of 10–30 µL. So, although the lowest drop sizes should favor extraction kinetics because of the larger ratio of area

to bulk phase volume, A_i / V_c ,⁽³⁹⁾ this contribution was not high enough to compensate for the higher amount of analyte extracted as the V_c / V_{aq} increased. Consequently, 30 μL drops were selected for further studies. At this point it is important to make it clear the linear dependence of the volume of coacervate produced in a solution as a function of the surfactant concentration. That is to say, the amount of supramolecular aggregates (e.g. vesicles) per coacervate volume unit is constant, so similarly to organic solvents, the composition of coacervate drops keeps constant.

3.3.3. Parameters affecting extraction kinetics

In SDME, extraction rates are strongly dependent on factors influencing the overall mass transfer coefficient of analytes, β_o , namely stirring rate, temperature and electrolyte. In order to gain some insight into the behaviour of the SDCME, the influence of these factors on the extraction rate of chlorophenols was investigated.

Figure 5a shows that the agitation of the sample caused an important increase in the analytical response for chlorophenols up to about 200 rpm and then it scarcely influenced the extraction efficiency. A stirring rate of 300 rpm was fixed for further microextractions. The distance between the needle tip and the stirring bar did not influence the extraction yield in the studied range, from 1.5 to 5.5 cm, however, although precision was not expected to be affected by sampling depth, the needle tip was positioned at the fixed height of 4.5 cm above the stirring bar. As the reproducibility of the analytical signal under non-equilibrium conditions is dependent on the reproducibility of the stirring rate, we assessed it by measuring stirring rates with a laser handheld tachometer for 4 h, at 10 min intervals. The relative standard deviation calculated for stirring rates was around 1%.

The temperature was critical for the extraction of chlorophenols (Figure 5b). Peak areas increased between 1.5 and 2.5 times when the temperature did from 20 to 50° C, probably because of the increase in the chlorophenols diffusion coefficients. The formation of air bubbles around the droplet when the temperature was near to 50° C resulted in drop instability and sometimes, dislodgement of the drops from the microsyringe needle occurred during extraction. On the other hand,

[39] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235

temperatures below 15° C were not feasible for extraction because they caused gelation of the coacervate drop. So, a temperature of 40° C is recommended for extraction of chlorophenols as a compromise between sensitivity and experimental convenience.

Addition of salt to samples in a wide concentration range (e.g. 0–30%, w/v) has been found to cause contradictory effects on the efficiency of SDME^(2,13). On the one hand, the salting-out effect produced enhanced extraction as the salt concentration increased, but on the other hand the presence of salt changed the physical properties of the extraction film, thus reducing the diffusion rates of the analytes into the drop⁽²⁾. With regard to chlorophenols, decreased extraction efficiencies have been obtained for SDME with hexyl acetate by increasing salt concentration⁽¹²⁾, whereas the salting-out effect increased the extraction efficiency of SDME with ionic liquids up to a sodium chloride concentration of 20% ⁽⁴⁰⁾. The effect of sample salinity on SDCME was investigated by adding sodium chloride concentrations between 0.01 and 0.5 M to a 20-mL sample containing 20 µg L⁻¹ of chlorophenols. No effects were observed on the analytical signals for chlorophenols or drop characteristics for sodium chloride concentrations below 0.1 M. However, higher salt concentrations caused drop instability and the stirring rate had to be decreased to prevent drop dislodgement from the needle tip (e.g. 80 rpm in the presence of 0.5 M NaCl). This behaviour was probably due to the reduction of the cohesion forces between molecules in the vesicle as a result of the screening of the surfactant-coacervating agent ionic interactions. So, the influence of the ionic strength on SDCME will depend on the intermolecular forces involved in the formation of the supramolecular aggregate making the coacervate up. No salt addition was performed in further studies.

3.3.4. pH

Sample pH was expected to be an important factor for the SDCME of chlorophenols. In conventional liquid–liquid extraction methods, it is usually required the acidification of the sample in order to have the neutral forms of these compounds and thus increasing recoveries. In principle, decanoic acid vesicles in the coacervate have the capacity to extract both the neutral and the deprotonated forms of chlorophenols (see Figure 3), so the extraction efficiency of SDCME was

[40] J.F. Peng, J.F. Liu, X.L. Hu, G.B. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 165

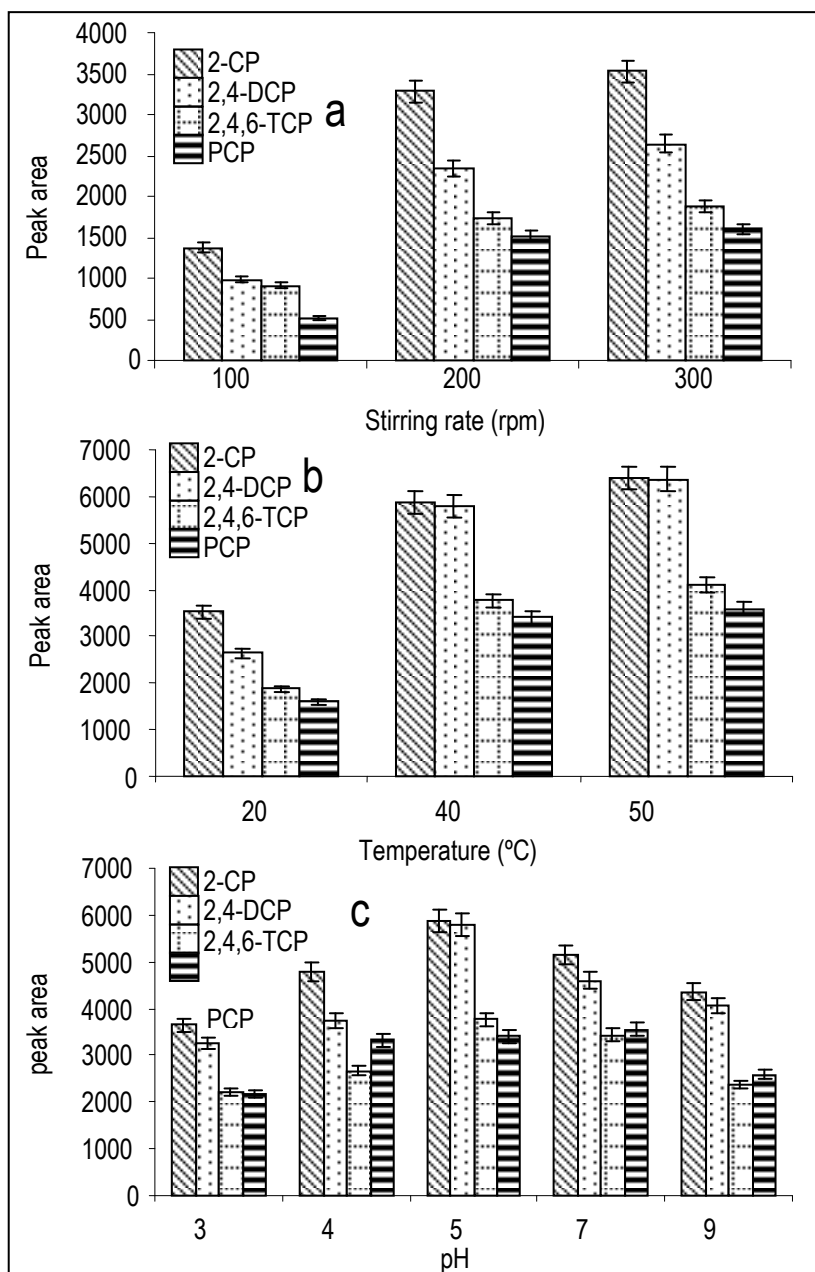


Figure 5: Effect of (a) the stirring rate, (b) the temperature and (c) the pH on the analytical signal obtained for chlorophenols after SDCME. Experimental conditions: Sample volume: 20 mL; drop volume: 30 μL ; concentration of chlorophenols: 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ each; extraction time: 60 min. (a) Temperature: 20° C; pH 5; (b) stirring rate: 300 rpm; pH 5 and (c) stirring rate: 300 rpm; temperature: 40° C.

assessed by changing the sample pH from 3 to 9. In this interval, both the neutral and/or ionized forms were present (pK_a values were 8.5 ± 0.1 , 8.05 ± 0.18 , 6.59 ± 0.23 and 4.68 ± 0.33 for CP, DCP, TCP and PCP, respectively). Figure 5c shows the results obtained. According to them, maximal extraction efficiencies were achieved at pH values around 5, independently of the ionization constant values for chlorophenols. So, it seems that both neutral and ionized chlorophenols were efficiently extracted by the coacervate and that additional factors contributed to recoveries in the range of pHs studied. Probably, the hydrochloric acid and sodium hydroxide used to adjust the pH caused modifications in the physical properties of the extraction film which resulted in decreased extraction efficiencies at the highest and lowest pH investigated. Vesicular coacervate drops became unstable under stronger acidic conditions (e.g. pH 2) in a similar way to that occurring under the addition of salt. A pH value of 5 was selected for the extraction of chlorophenols.

3.3.5. Influence of environmental water matrix components on coacervate drop stability

The influence of environmental matrix components on the characteristics of vesicular coacervate drops was investigated. For this purpose, water samples from different origin and composition were selected, namely raw wastewater, superficial water from a reservoir and groundwater. It was found that SDCME could not be implemented in some untreated water samples because the drop became turbid owing to the precipitation of calcium decanoate. Turbidity was observed at calcium concentrations above 100 mg L^{-1} . The interference was removed by adding EDTA (1.5 g L^{-1}) to the samples before immersing the drop. This concentration was selected on the basis that maximal levels of calcium usually found in environmental water samples do not usually exceed 150 mg L^{-1} .⁽⁴¹⁾ Anyway, the possible interference of samples containing more calcium can be easily detected and corrected.

3.4. Analytical performance

Table 1 shows the figures of merit of the proposed method. Because SDCME is not an exhaustive technique, linearity for these compounds was

[41] J.C. Briggs, J.F. Ficke, Quality of rivers of the United States, 1975 Water Year-based on the National Stream Quality Accounting Network (NASQAN), US Geological Survey Open-File Report, Reston, VA, 1977, p. 78

investigated by extracting aqueous solutions (20 mL) containing different concentrations of the target compounds. Correlation between peak areas and the initial aqueous concentration of chlorophenols was determined by linear regression and was in the range 0.994–0.998, indicating good fits. Detection limits were calculated from 5 blank extractions using a signal-to-noise ratio of 3 and were in the range 0.1–0.3. The precision of the analytical procedure was determined by extracting five water samples spiked with a mixture of phenols (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ each). The relative standard deviations ranged between 4.3 and 5.6%.

Table 1: Quantitative results of SDCME and LC-UV for determination of chlorophenols in water

Analytes	Linearity range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Correlation coefficient (r^2)	LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD ^{a,b} (%)
CP	2-500	0.997	0.1	5.6
DCP	2-500	0.994	0.1	4.3
TCP	2-500	0.990	0.1	4.4
PCP	4-500	0.998	0.3	4.8

^a n=5; ^bspiking level=20 $\mu\text{g L}^{-1}$

3.5. Environmental water analysis

The developed method was applied to the determination of chlorophenols in environmental waters, namely, wastewater, water from a reservoir and groundwater. EDTA (1.5 g L^{-1}) was added to the samples before extraction to avoid the formation of calcium decanoate in the coacervate drop. The concentrations of chlorophenols in the samples, if any, were below the detection limits. So, these samples were spiked with concentrations in the range 5–20 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each target analyte to assess matrix effects. Experiments were made in triplicate. Table 2 shows the results obtained, expressed as apparent recoveries according to the IUPAC definition⁽⁴²⁾ ($R = x_{(\text{exp})} / x_{(\text{theor})}$, where $x_{(\text{exp})}$ is the value experimentally obtained from the calibration graph and $x_{(\text{theor})}$ is the fortified value). These recoveries were from 79 to 106%, so after removal of the calcium interference, the rest of water matrix components did not interfere in the determination of chlorophenols. Figure 6 shows some of the chromatograms obtained from spiked distilled water, wastewater and groundwater samples.

[42] D.T. Burns, K. Danzar, A. Townshend, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 2201

Table 2: Mean apparent recoveries (%) \pm standard deviation^a of chlorophenols in spiked water samples

Samples	Spiking level ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CP	DCP	TCP	PCP
Wastewater	5	79 \pm 5	86 \pm 7	98 \pm 5	104 \pm 6
	10	97 \pm 4	99 \pm 5	85 \pm 6	94 \pm 4
	20	91 \pm 8	91 \pm 8	89 \pm 5	94 \pm 6
Reservoir	5	100 \pm 4	106 \pm 3	92 \pm 7	105 \pm 3
Groundwater	5	84 \pm 6	96 \pm 7	102 \pm 4	92 \pm 6

^an=3

3.6. Comparison of SDCME with other methods

Chlorophenols can be determined by both LC and GC and a great effort has been carried out in the last few years to reduce time and solvent consumption during sample preparation. As a result, different microextraction techniques have been applied for the extraction of chlorophenols from environmental waters and especially successful have been liquid-phase microextraction (LPME)^(12,43) and SDME.⁽⁴⁴⁾ Table 3 compares the main characteristics of these methods, including those of the SDCME-based method here proposed. GC–MS is by far the most sensitive technique for the determination of chlorophenols,^(12,44) however the need for derivatization increases the time and complexity for sample preparation and this fact has fostered the development of LC-based methods. On the other hand, apparent recoveries in real water samples were only of around 70%⁽⁴⁴⁾ or were not investigated.⁽¹²⁾ The use of electron capture detection in GC⁽⁴⁵⁾ did not provide significant advantages compared to MS, except that of lower cost of the instrument, since derivatization was also required and the sensitivity was dramatically dependent on the number of chloro atoms. LC-UV is easily available in most of labs and offers adequate sensitivity and selectivity. The analytical characteristics of the method here proposed are similar to those obtained using LPME (400 μL n-hexane) with back extraction (1 μL basic solution)⁽⁴³⁾ and hollow fiber-protected LPME based on the immobilization of an ionic liquid in the hollow fiber.⁽⁴⁰⁾ The use of SCDME improves the detection limits, as a result of the number of interactions that the

[43] H. Bagheri, A. Saber, S.R. Mousavi, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 27[44] N. Fattahi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E.Z. Jahromi, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 23[45] L. Zhao, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 931 (2001) 95.

vesicular coacervate can establish with analytes, and permits the direct use of the drop into the sample solution, which simplifies the extraction procedure.

Table 3: Comparison of SDCME-LC-UV with other microextraction methods for chlorophenols

Method	Analytes	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%) (spiking level)	Apparent recovery (%) in real water samples (spiking level)	Derivatization	References
LPME/BE-LC-UV	CP, DCP	0.5-2.5	5.6-10.6 (200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	74-93 (20 $\mu\text{g L}^{-1}$) 91-102 (200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	No	[45]
HF/LPME-LC-UV	CP, DCP, TCP	0.5-1	4.3-5.9 (5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	70-96 (5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	No	[40]
SDCME-LC-UV	CP, DCP, TCP, PCP	0.1-0.3	4.3-5.6 (20 $\mu\text{g L}^{-1}$)	79-105 (5-20 $\mu\text{g L}^{-1}$)	No	Proposed method
DLLME-GC-ECD	CP, DCP, TCP, TeCP, PCP	0.01-2	1.7-7.1 (2-200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	80-101 (0.4-200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Yes	[45]
SDME-GC-MS	CP, DCP, TCP, PCP	0.004-0.061	5.6-12 (2.3-4 $\mu\text{g L}^{-1}$)	—————	Yes	[12]
SDME-GC-MS	CP, DCP, TCP	0.005-0.022	1.8-10.2 (0.5-1 $\mu\text{g L}^{-1}$)	70 (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Yes	[44]

LPME: liquid-phase microextraction; BE: back extraction; HF: hollow fiber; DLLME: dispersive liquid-liquid microextraction

4. Conclusions

The miniaturization of coacervate-based extractions is in itself interesting because of the reduction in the consumption of reagents it involves. But, above all, it is a valuable strategy to extend the applicability of SDME to areas where the use

of conventional water immiscible organic solvents is less effective or not adequate, e.g. when LC is used for the separation of analytes or when the extraction of polar or ionic organic compounds is of interest. The main benefits which coacervates can bring in derive from the number of simultaneous interactions they provide (e.g. vesicles can solubilize analytes by Van der Waals, hydrogen bond, ionic and π -cation interactions), so coacervates can be considered as multifunctional solvents which have the capability to extract a wide variety of compounds efficiently. On the other hand, their compatibility with LC, which is also a very versatile separation technique, ensures the simultaneous determination of the variety of chemicals extracted. The system here described is applicable to real-world samples that possess complex matrices. As it has been previously commented, the coacervate-based extraction is a well-established technique and this facilitates its implementation in SDME. Analytes efficiently extracted by conventional coacervative extraction will also be extracted by SDCME, the sensitivity depending on the extraction time.

Microextractions with coacervates fit to the thermodynamic and kinetic equations derived for conventional solvents, so both types of extractants behave similarly with respect to most of the experimental parameters (e.g. extraction time, drop volume, stirring rate, etc.) and both share the same limitations (e.g. time to reach equilibrium conditions are not practicable and, like all microextraction techniques, SDME is not exhaustive, which decreases sensitivity and precision and compels us to use standards prepared in the same way that samples). No specific limitations associated to the use of coacervates have been found.

Work currently in progress is focused on increasing extraction kinetics of SDCME with the aim of obtaining the maximum sensitivity at shorter extraction times. Faster extractions will require increasing the interfacial area between the coacervate and the sample solution. The importance of this parameter on SDCME, where relatively high drop volumes are used and therefore low A_i/V_c ratios are obtained, was checked by dispersing a 20- μ L coacervate drop into the sample solution and then analysing the extracted PCP at different times. Equilibrium was reached after a 15-min extraction. So, we are investigating the capability of coacervate films as solvents in microextractions.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from MEC (Project CTQ 2005-00643). F.J.L.-J. acknowledges to the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (AP2003-2840). The authors also thank to the personnel from the municipal WWTPs of Mengíbar and Bailén (Jaén) for kindly collecting the sewage water samples. We specially thank the Environmental Management and Services Company (EGEMASA) from Puentegenil (Córdoba) its collaboration in providing us different types of wastewater samples.

RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. INTRODUCCIÓN

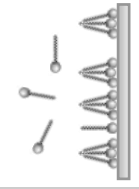
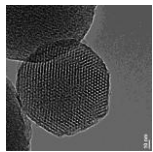
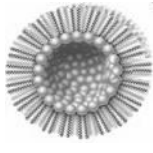

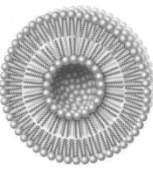


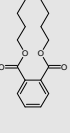
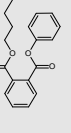




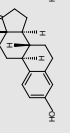
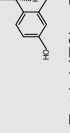









En las investigaciones que se presentan en esta Memoria se ha abordado el empleo de los sistemas supramoleculares en la etapa analítica de extracción/preconcentración de varios tipos de muestra, previa a la separación de los analitos mediante cromatografía de líquidos. En la Tabla 1 se resumen, asociados a cada sistema extractante empleado, las muestras analizadas y los analitos determinados incluyendo, para cada uno de ellos, las características más relevantes para los procesos de extracción considerados.

Se han desarrollado seis aplicaciones para la extracción de sustancias orgánicas utilizando agregados supramoleculares que actúan, bien de forma directa, siendo el propio extractante (hemimicelas y coacervados), o de forma indirecta, participando como director de la estructura como es el caso de los materiales mesoporosos.

Los sistemas extractantes se han usado en formatos diferentes, demostrando su gran versatilidad. Así, las hemimicelas de dodecilsulfato sódico sobre alúmina y los materiales mesoporosos se han utilizado como materiales adsorbentes en los cartuchos de extracción convencionales usados en extracción en fase sólida mientras que los disolventes supramoleculares se han usado en tres formatos, uno de los cuales se ha descrito recientemente por nuestro grupo de investigación (microextracción líquido-sólido)⁽¹⁾ y otro se presenta por vez primera en esta memoria (microextracción en una gota).

[1] Costi, E. Sicilia M.D., Rubio, S. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1447

Tabla 1: Resumen

	Hemicelas	Sólidos mesoporosos	Micelas inversas de decanoico	Micelas inversas de decanol	Vesículas octanoico	Vesículas decanoico
Sistema Extractante						
Formato	Extracción en fase sólida	Extracción en fase sólida	Microextracción líquido-líquido-sólido	Microextracción líquido-sólido	Microextracción líquido-sólido	Microextracción en una gota
Muestras	Aguas residuales urbanas	Aguas residuales urbanas y fluviales	Salsas condimentadas con chile	Sedimentos	Carnes, pescados y alimentos infantiles	Aguas residuales; agua de embalse y de pozo
Análitos Estructura	<p>Bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP) </p> <p>Butil bencil ftalato (BBP) </p> <p>Dibutil ftalato (DBP) </p>	<p>Sudán I </p> <p>Sudán II </p> <p>Sudán III </p> <p>Sudán IV </p>	<p>Estrona (E1) </p> <p>Estimilestradio(EE2) </p> <p>Estriol (E3) </p>	<p>Benzo[a]pireno (BaP) </p> <p>Benzo[a]antraceno (BaA) </p> <p>Benzo[b]fluoranteno(BbF) </p> <p>Criseno (CHR) </p>	<p>2-Clorofenol (CF) </p> <p>2,4-Diclorofenol (DCF) </p> <p>2,4,6-Triclorofenol (TCF) </p> <p>Pentaclorofenol (PCF) </p>	

Polaridad (K_{ow}) [a]	DEHP: 7.6 DBP: 4.73 BBP: 4.5	Desde -4,6 a 7,31	Sudán I: 5.51 Sudán II: 6.60 Sudán III: 7.63 Sudán IV: 8.72	E1: 3.13 E2: 4.01 EE2: 3.67 E3: 2.45 BPA: 3.32	BaP: 6.13 BaA: 5.67 BbF: 5.78 CHR: 5.81	CF: 2.22 DCF: 3.10 TCF: 3.77 PCF: 5.11
(pK_a) [a]	—	—	Sudán I: 13.50 Sudán II: 13.50 Sudán III: 13.44 Sudán IV: 13.52	E1: 10.4 E2: 10.4 EE2: 10.3 E3: 10.4 BPA: 9.73	—	CF: 8.50 DCF: 9.47 TCF: 6.59 PCF: 4.68
N° de Aceptores/donadores de H⁺ [a]	4/0	1/0	Sudán I: 3/1 Sudán II: 3/1 Sudán III: 5/1 Sudán IV: 5/1	E1: 2/1 E2: 2/2 EE2: 2/2 E3: 3/3 BPA: 2/2	—	1/1
Tipos de interacción es posibles	Fuerzas de dispersión; Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	Fuerzas de dispersión; Puentes de hidrógeno	Fuerzas de dispersión; Puentes de hidrógeno	π -catión Fuerzas de dispersión;	π -catión Fuerzas de dispersión; Puentes de hidrógeno

[a] Valores calculados; aportados por <http://scifinder.cas.org>

Con el adsorbente hemimicelar se extrajeron diésteres del ácido ftálico (llamados comúnmente ftalatos): bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP), butil bencil ftalato (BBP) y dibutil ftalato (DBP) en aguas residuales urbanas, tanto efluentes como influentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) de Puente Genil, Lucena, Arahal, Linares y Bailén. Estos compuestos se caracterizan por una elevada hidrofobicidad y la presencia en sus estructuras de centros aceptores de protones. Esto posibilita que puedan establecerse con los extractantes mecanismos mixtos de solubilización (fuerzas de dispersión y formación de puentes de hidrógeno).

La extracción en fase sólida que se llevó a cabo con materiales mesoporosos tuvo como objetivo evaluar la capacidad de extracción de compuestos en un amplio intervalo de polaridad basada en interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de dispersión. Se propuso la determinación de tensioactivos catiónicos alquil-dimetil-bencil amonio (C_{n+1} -DBA) en las aguas procedentes de la entrada y salida de las EDARs de Mengíbar y Bailén. C_{12} -DBA, C_{14} -DBA y C_{16} -DBA poseen constantes octanol-agua (K_{ow}) desde 1.69 para el C_{12} -DBA hasta 4.89 para el C_{16} -DBA y además cuentan con un grupo aceptor de protones que le permite establecer puentes de hidrógeno con los grupos silanoles terminales del material mesoporoso silíceo. Asimismo existe efecto plantilla debido a que durante la adsorción se recupera la estructura que sirvió de base a la formación del material mesoporoso.

El disolvente supramolecular sintetizado a partir de micelas inversas de ácido decanoico en tetrahidrofurano se empleó para llevar a cabo una microextracción líquido-líquido-sólido en la que la muestra se pone en suspensión en un sistema de dos fases líquidas constituidas por el coacervado y la disolución en equilibrio con el mismo. Una vez realizada la extracción, el soluto puede distribuirse en tres fases (sólido residual, coacervado y disolución de equilibrio) de acuerdo a las respectivas constantes de distribución. Este sistema se ha empleado con el fin de analizar el contenido de los colorantes ilegales Sudán I, II, III y IV en diversas salsas preparadas que contenían chile como ingrediente en su fabricación, donde en ocasiones se ha detectado la presencia fraudulenta de estos compuestos en alimentos importados a Europa. Se seleccionaron salsa de tomate, salsas para carne y salsas de vinagre (tipo tabasco). Estos compuestos son muy hidrófobos y poseen un grupo hidroxilo que es difícilmente disociable como demuestra su elevado valor de pK_a , muy próximo a 14. Por otro lado, la presencia de grupos aceptores y donadores de

protones permite que se establezcan puentes de hidrógeno entre los analitos y el sistema extractante, además de las interacciones de dispersión.

Para la microextracción de sustancias estrogénicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) carcinogénicos (BaP, BaA, BbF y CHR) en alimentos (pescados, moluscos, carnes y alimentos infantiles), se utilizó un formato de microextracción recientemente propuesto por nuestro grupo de investigación.⁽¹⁾ Los disolventes supramoleculares constituidos por micelas inversas de decanol o por vesículas de ácido octanoico/octanoato de tetrabutilamonio, se preparan convencionalmente y a continuación, se separan a partir de la disolución acuosa en equilibrio y se adiciona directamente sobre la muestra. La solubilización de las sustancias estrogénicas en el disolvente de micelas inversas, ocurre mediante un doble mecanismo: interacciones de dispersión y puentes de hidrógeno. La solubilización de los PAHs en el disolvente constituido por vesículas ocurre a través de un mecanismo mixto de interacción en el que actúan las fuerzas de dispersión (K_{ow} en torno a 6) y las interacciones tipo π -catión, entre la nube electrónica π de los anillos aromáticos de los PAHs, y el grupo catiónico del tetrabutilamonio que se sitúa en la superficie de las vesículas que conforman el disolvente.

Por último se ha desarrollado por vez primera la microextracción en una gota de disolvente supramolecular constituido por vesículas de ácido decanoico/decanoato de tetrabutilamonio. El procedimiento se aplicó a la extracción de clorofenoles en aguas residuales procedentes de EDARs, aguas de pozo o aguas de un embalse. Los clorofenoles seleccionados para establecer los aspectos teóricos y prácticos más relevantes del proceso de microextracción en una gota de disolvente supramolecular fueron CF, DCF, TCF y PCF. Los analitos en cuestión establecen interacciones mixtas con el disolvente supramolecular a través de fuerzas de Van-der-Waals (más intensas a medida que aumenta el número de átomos de cloro en la molécula), interacciones π -catión y puentes de hidrógeno, ya que los clorofenoles poseen dos centros donadores/aceptores de hidrógeno.

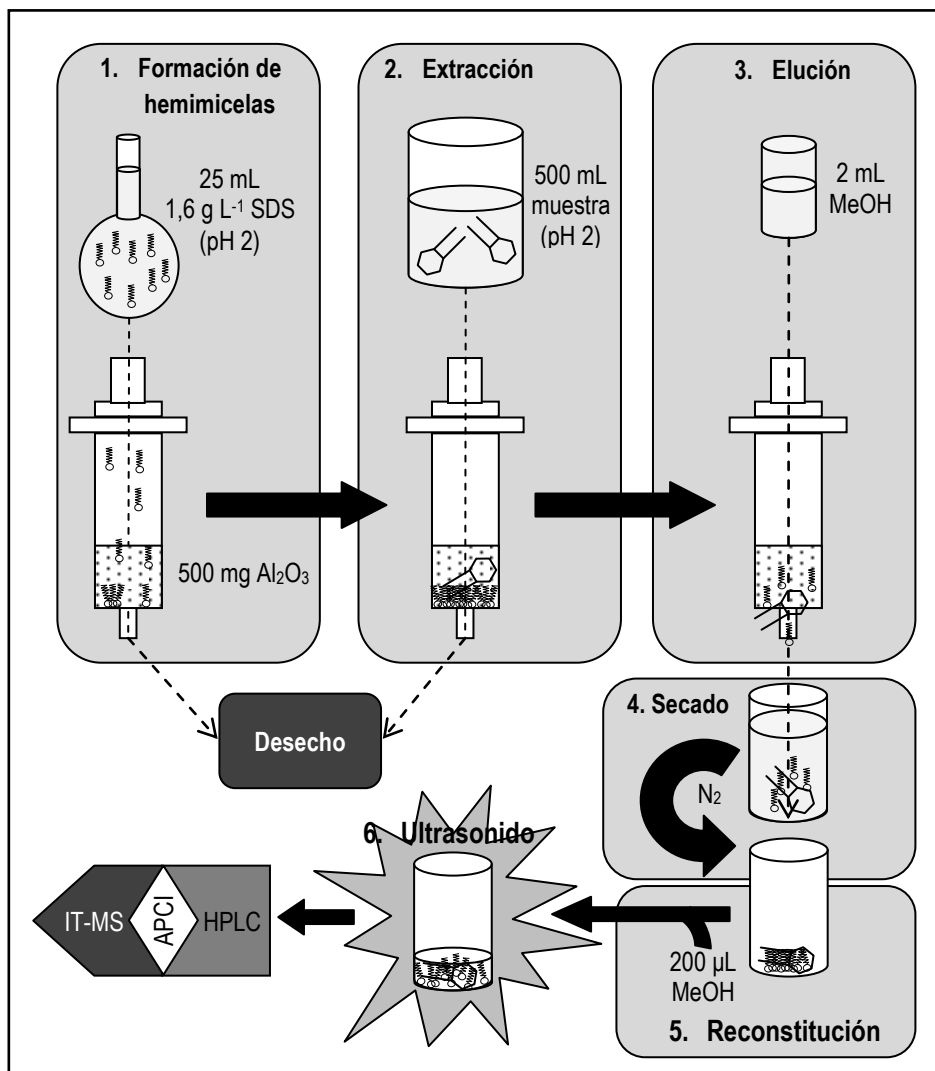


Figura 1: Esquema del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de ftalatos en aguas residuales

2. MATERIALES ADSORBENTES PARA SPE

2.1. Hemimicelas de dodecilsulfato sobre alúmina para la extracción de ftalatos en aguas residuales

Se ha desarrollado un método para la determinación de ftalatos (dibutil ftalato (BBP), butil-bencil ftalato (BBP) y bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP) en aguas

residuales basado en su extracción y concentración con hemimicelas de dodecilsulfato sódico con alúmina y posterior cuantificación con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. En la Figura 1 se resume el procedimiento llevado a cabo y a continuación se discuten los resultados y aspectos más relevantes de este estudio.

2.1.1. Formación de hemimicelas

La formación de hemimicelas de SDS se produce in situ al filtrar una disolución del tensioactivo (pH 2) a través de una típica columna de extracción en fase sólida que contiene 500 mg de alúmina, previamente acondicionada con una disolución de ácido nítrico 10^{-2} M. La adsorción de SDS sobre el óxido mineral se produce a través de interacciones electrostáticas, aunque también existen fuertes interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo lo que produce las típicas estructuras de “teepee” que conforman las hemimicelas

El pH al que se produce la adsorción determina la cantidad de tensioactivo que puede adsorberse ya que de este parámetro depende la densidad de carga de la superficie del óxido mineral. El punto de carga cero (pcz) de la alúmina está en torno a 8.5 lo que implica que la superficie del óxido tiene carga positiva a valores de pH inferiores a 7 y la densidad de carga aumenta a medida que disminuye el pH.

En la Figura 2 se muestran las isotermas de adsorción de SDS sobre alúmina a pH 2 y 6. Se observa que la carga máxima del tensioactivo en la región de hemimicelas es aproximadamente el doble a pH 2. Por otro lado, la cantidad de tensioactivo en disolución que se encuentra en equilibrio con el SDS adsorbido es mayor a medida que aumenta el pH, lo que implica que la pérdida gradual de tensioactivo adsorbido durante la filtración de grandes volúmenes de muestra será mayor y se requerirá el aporte de SDS con la muestra para mantener constante la composición del adsorbente.

En las condiciones experimentales propuestas para la extracción de ftalatos (pH 2) la cantidad adsorbida de SDS sobre alúmina es de 80 mg por gramo de alúmina y la concentración de SDS que se eluirá durante la filtración de la muestra será despreciable y por tanto se mantiene constante la composición del adsorbente.

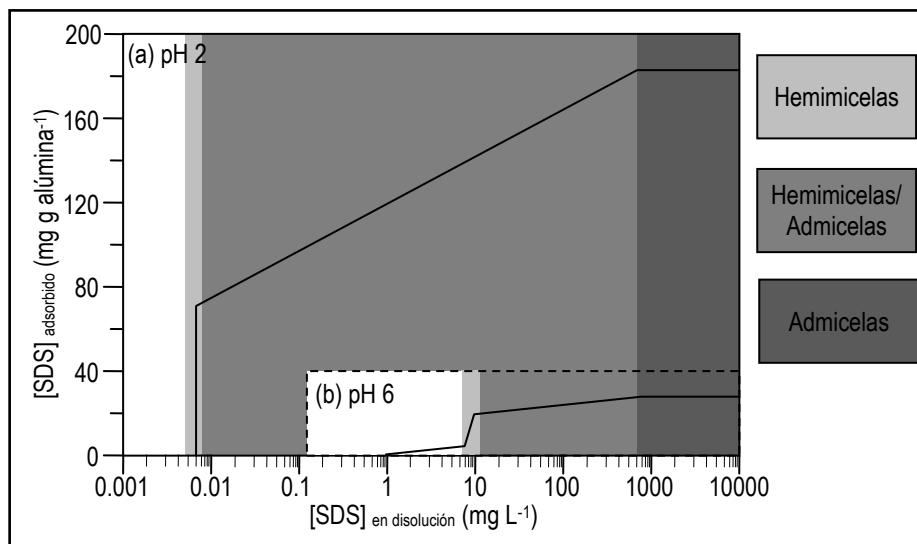


Figura 2: Isotermas de adsorción de SDS sobre alúmina a pH (a) 2 y (b) 6

2.1.2. Muestras

Las muestras objeto de estudio fueron aguas residuales procedentes de las plantas depuradoras (EDARs) (Figura 3) de Linares, Puente Genil y Lucena (en la provincia de Córdoba), Bailén (Jaén) y Arahál (Sevilla). Dichas aguas son de composición variable ya que depende de la actividad que se desarrolle en cada momento en la zona de influencia de la planta. En todos los casos estudiados, los aportes de aguas de origen doméstico se unen a otros de origen industrial en proporciones que dependen de la actividad que se produzca en cada localidad. Así, en Puente Genil la industria agroalimentaria aporta una cantidad de agua residual que supone entre el 70 y el 80% del total; en Lucena entre el 40 y el 50% de las aguas residuales tratadas proviene de las factorías de fabricación de mobiliario y de orfebrería; en Linares, la industria asociada a la fabricación de automóviles aporta entre un 30 y un 50% del total de los influentes de la depuradora; y finalmente, la EDAR de Bailén recibe en torno al 20-30% de una industria en la que destaca la fabricación de materiales de construcción.



Figura 3: Vista de una típica EDAR

Independientemente del origen, las aguas residuales contienen materia orgánica, constituida fundamentalmente por carbohidratos, grasas, proteínas y tensioactivos, y sales inorgánicas entre las que destacan carbonatos de calcio y magnesio, sales sódicas y potásicas y diferentes minerales. Estos componentes pueden afectar la adsorción del tensioactivo sobre el óxido mineral y por tanto influenciar la adsolubilización de los analitos en el adsorbente.

La influencia de los componentes de las aguas residuales ha sido previamente investigada por nuestro grupo de investigación⁽²⁾ considerando tres grupos de sustancias que pueden afectar a las isotermas de adsorción de dodecilsulfato sobre alúmina: electrolitos, agentes precipitantes y materia orgánica:

1. Los electrolitos disueltos en el agua pueden modificar la adsorción de SDS sobre alúmina de dos modos, dependiendo del agregado sobre el que estén interactuando: (a) *durante la formación de hemimicelas*, la adsorción de SDS disminuye en presencia de electrolitos, ya que se produce una relación competitiva entre ambos por la superficie de la alúmina; mientras que (b) *una vez cubierta toda la superficie por el tensioactivo*, la presencia de electrolitos provoca una apreciable reducción de la repulsión iónica entre los grupos de cabeza del SDS con lo que se mejora la interacción de los nuevos monómeros sobre los ya adsorbidos para formar la estructura admicelar. De esta forma, resulta desaconsejable usar el inicio de la región hemimicelar cuando se prevé la presencia de electrolitos en la muestra ya que disminuye ampliamente la cantidad de adsorbente disponible para la extracción,

[2] García-Prieto, A.; Lunar L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1823

disminuyendo la retención de los analitos y, por tanto, el volumen de ruptura. Sin embargo, como ya se ha comentado, una vez que la superficie del óxido mineral está cubierta por el tensioactivo, la presencia de los electrolitos no tiene influencia, hecho que ocurre al final de la región hemimicelar que es, precisamente, la que se recomienda emplear para extracciones en fase sólida basada en hemimicelas.

2. La presencia de iones precipitantes del tensioactivo en la muestra acuosa, no afectará en las regiones en las que se hayan formado hemimicelas o admicelas conjuntamente, ya que la concentración de tensioactivo en disolución es despreciable. Por otro lado, en caso de precisar trabajar en la región de admicelas, será imprescindible la eliminación previa de estos iones precipitantes, ya que la concentración de monómeros en disolución es mucho más alta.

3. La materia orgánica en disolución que se encuentra habitualmente en un agua residual no tiene influencia sobre las isothermas de adsorción de SDS sobre alúmina a pH 2.

Así, tanto el final de la región hemimicelar como la región constituida por la mezcla de hemimicelas y admicelas son las más selectivas, lo que hace prever que los componentes de las muestras de las aguas residuales analizadas para la determinación de ftalatos no modifiquen el adsorbente hemimicelar propuesto.

2.1.3. *Extracción*

Se conoce como adsolubilización a la propiedad que tienen los agregados adsorbidos sobre superficies sólidas de interactuar con ciertas sustancias de manera que se permite su extracción. Como puede verse en la Figura 4, las hemimicelas de dodecil sulfato sobre alúmina a pH 2 permiten extraer ftalatos con un rendimiento próximo al 100% gracias a la fuerte interacción hidrófoba establecida entre los analitos y los agregados, que además proporciona volúmenes de ruptura superiores a un litro. Sin embargo, puede observarse en la Figura 4 cómo una vez alcanzado el nivel de tensioactivo en disolución que sobrepasa la concentración micelar crítica, el rendimiento de la extracción baja rápidamente debido al reparto de los analitos entre las micelas acuosas y los agregados hemimicelares. De esta forma, estarían disponibles para llevar a cabo la extracción la región hemimicelar, la región mixta (en la que se encuentran hemimicelas y admicelas) y la región admicelar sin que se

sobrepase la concentración micelar crítica en disolución. Sin embargo y tal como se ha apuntado anteriormente, la formación de admicelas lleva aparejado un reparto de tensioactivo entre el sólido mineral y el tensioactivo en disolución lo que tiene como consecuencia la pérdida de tensioactivo lo que obliga a añadir a la muestra la cantidad adecuada de SDS para mantener el equilibrio. Es por esto que, teniendo en cuenta que la extracción obtenida es cuantitativa en todas las regiones, se prefiere la zona hemimicelar en la que no es necesario añadir tensioactivo durante la percolación de la muestra y más concretamente el final de esta zona (en torno a 80 mg de SDS por g de alúmina) ya que así aseguramos la máxima capacidad adsorbente del agregado.

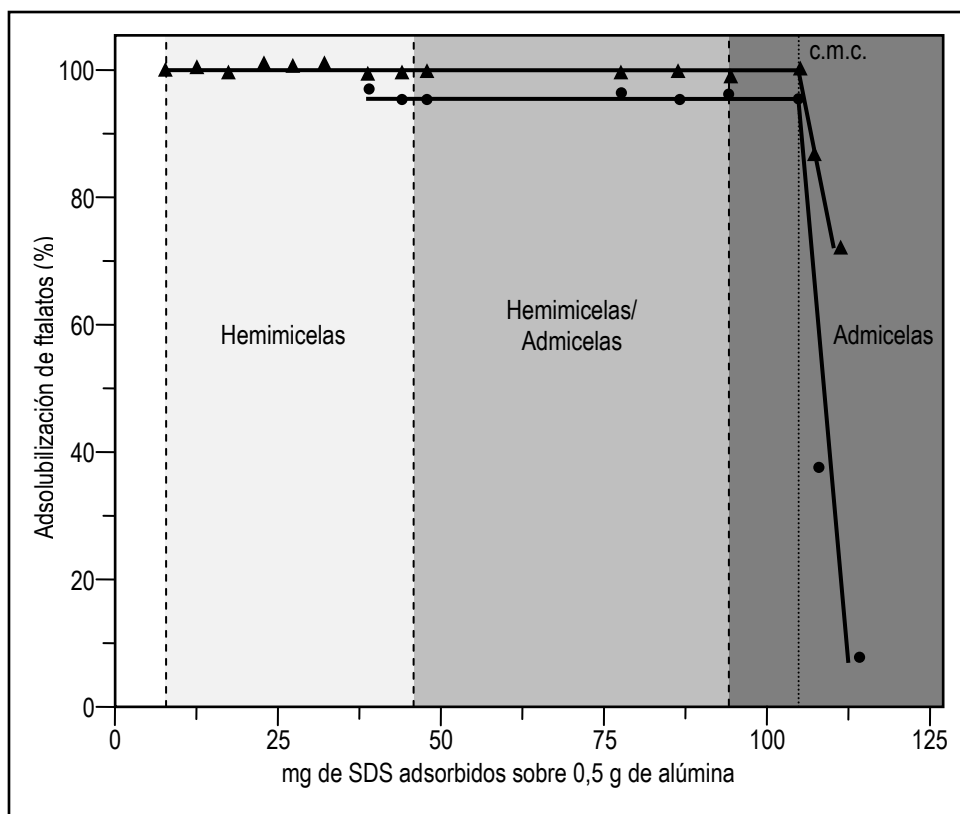


Figura 4. Efecto de la cantidad de SDS adsorbido sobre la alúmina en la adsolubilización de (●) DEHP y (▲) BBP

El estudio de la idoneidad de los diferentes agregados de SDS adsorbidos sobre alúmina para la extracción de ftalatos se llevó a cabo tomando como referencia la adsolubilización total de los analitos en los respectivos agregados

estudiados (Figura 4), para lo cual se utilizó DEHP y BBP, omitiéndose el estudio con DBP debido a la similitud de propiedades con DBP (Tabla 1). El estudio se llevó a cabo con experimentos en “batch” en los que se añadían todos los componentes del sistema (alúmina, tensioactivo, analitos y agua a pH 2) en un vaso de precipitado. De esta forma, la presencia de micelas en el agua de ensayo permitió la solubilización de cantidades de DEHP muy por encima de su solubilidad (calculada en $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (3)), aunque fue imposible evaluar la idoneidad de los agregados cuando la concentración de SDS estaba por debajo de la concentración micelar crítica en la disolución acuosa empleada para el ensayo en “batch”.

Para la etapa de elución se ensayaron los disolventes orgánicos metanol y acetonitrilo a diferentes volúmenes, obteniéndose una recuperación cuantitativa con 2 mL de metanol, mientras que el acetonitrilo demostró ser menos eficiente.

El volumen de ruptura (volumen de muestra para el cual la recuperación de analitos disminuye en un 5%) permitido por el método propuesto fue como mínimo de 1 L.

La solubilidad de DEHP es de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (tomada como referencia por ser la más baja de los ftalatos considerados), por tanto es de esperar que la concentración en agua filtrada no supere dicha concentración. Un factor de preconcentración de 250 (500 mL de muestra y 2 mL de eluyente) proporciona un límite de detección superior a $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ lo que impediría cuantificar a niveles muy comunes en aguas próximos a la solubilidad de DEHP. Incluso aumentando el volumen de la muestra a 1 L, el límite de detección obtenido sería demasiado alto. Es por eso que se optó por una concentración posterior a la elución mediante secado con flujo de nitrógeno y reconstitución en el menor volumen de metanol permitido: 200 μL lo que permite un nuevo límite de detección de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. El secado produce el atrapamiento de los ftalatos en el residuo seco de SDS provocando un descenso en la recuperación de más del 40%, por lo que es imprescindible la aplicación de ultrasonidos en el proceso de reconstitución para obtener recuperación cuantitativa.

[3] C.A. Staples, D.R. Peterson, T.F. Parkerton, W.J. Adams, *Chemosphere* 35 (1997) 667

2.1.4. Cuantificación

Para la cuantificación de los ésteres de ftalato una vez extraídos de las muestras de aguas residuales se empleó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con ionización química a presión atmosférica (APCI) y un analizador de trampa iónica. En la figura 5 se muestran diferentes cromatogramas que corresponden a una disolución estándar de los analitos en metanol y varias muestras de influentes de aguas residuales.

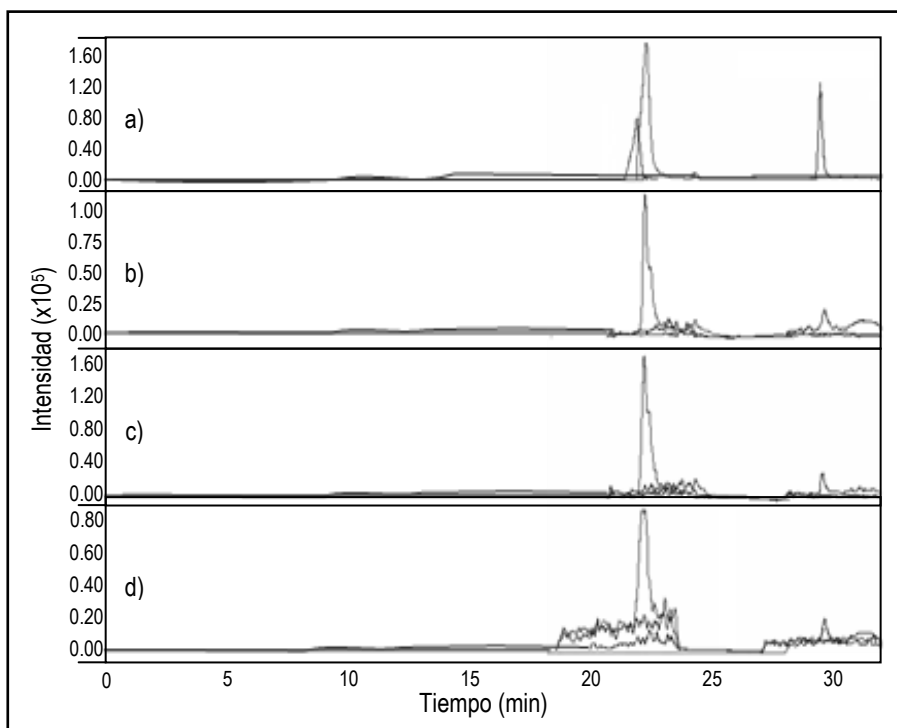


Figura 5: Cromatograma obtenido de (a) una disolución estándar (b-d) aguas residuales influentes procedentes de las EDARs de: (b) Puentegenil, (c) Lucena y (d) Arahal

Un aspecto a considerar cuando se trabaja con sistemas hemimicelares/admicelares es que el extracto, además de contener los analitos y los componentes solubles de la matriz, contiene una elevada cantidad de tensioactivo. Como componente de la fase móvil, el tensioactivo puede constituir una pseudofase donde se distribuyen los analitos y afectar a las constantes de distribución de los mismos. Sin embargo, el problema cromatográfico más común es la coelución. Dado el carácter iónico del SDS, su tiempo de retención es de 1,5 minutos por lo

que no existe coelución con los ftalatos de carácter marcadamente apolar y que presentan tiempos de retención más elevados.

No obstante, es aconsejable evitar la introducción de SDS en el espectrómetro de masas y por ello el flujo procedente de la columna cromatográfica se envía a desecho durante el tiempo en que el tensioactivo se eluye.

Las características analíticas del método se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Características analíticas del método propuesto

	DBP	BBP	DEHP
Sensibilidad ($\text{ng}^{-1} \times 10^5$)	4.25 ± 0.02	1.74 ± 0.04	14.5 ± 0.2
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.1	0.07	0.1
Precisión [RSD (%)]	4	2	5

El método permite la detección de los ésteres de ftalato estudiados a niveles de $0.007 \mu\text{g L}^{-1}$ para BBP y $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ para DBP y DEHP. Hasta la fecha solo la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (US EPA) ha establecido niveles máximos permitidos para DEHP en aguas a un valor de $6 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque considera un nivel objetivo (MCLG) de 0 para este contaminante. Por tanto, el método desarrollado puede utilizarse para el control de DEHP en aguas. Más recientemente y de acuerdo con la aprobación de la directiva marco de aguas, la Unión Europea aconseja que se controlen los vertidos locales de DEHP (2008/98/CE) y BBP (2008/447/CE) a ríos cuando éstas pueden constituir un riesgo ambiental. El método desarrollado permite la determinación de bajas concentraciones de los mismos y por tanto puede utilizarse para la caracterización de la calidad de aguas ambientales.

2.2. El sólido mesoporoso MSU-1 para la extracción en fase sólida de compuestos orgánicos.

Se ha evaluado la aplicabilidad del sólido mesoporoso síliceo MSU-1 como material adsorbente para su empleo en SPE, utilizado de dos formas: en primer lugar *per se*, y a continuación funcionalizado con un tensioactivo previamente adsorbido sobre su superficie. Se han seleccionado una gran variedad de compuestos

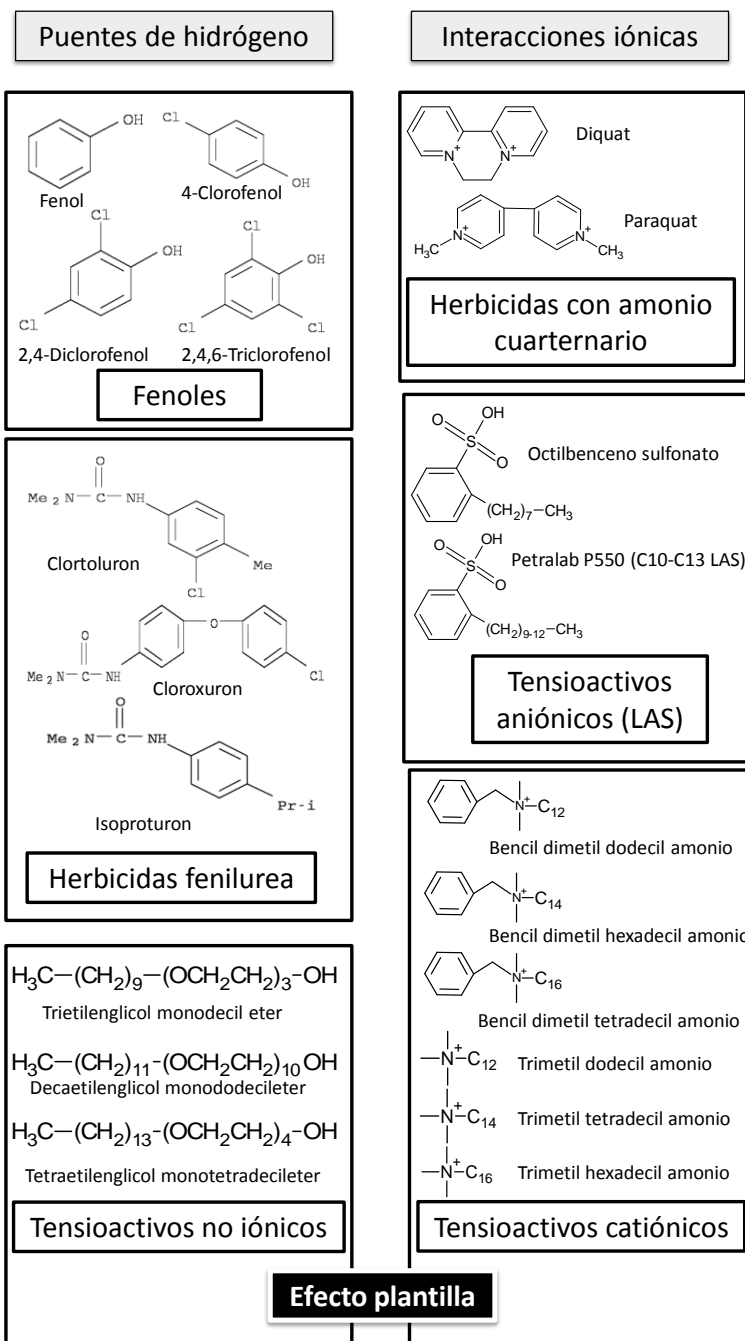


Figura 6: Analitos empleados para evaluar las características SPE de MSU-1

de diversa naturaleza para estudiarlos diversos mecanismos por los que se produce dicha adsorción. (Figura 6) Así, la interacción mediante puentes de hidrógeno se evaluó mediante la extracción con fenoles y fenilureas y las interacciones iónicas extrayendo herbicidas y tensioactivos iónicos. Asimismo, los tensioactivos catiónicos y no iónicos se emplearon para el estudio de un posible efecto plantilla en los rendimientos de extracción, ya que los agregados de tensioactivo son las estructuras de las que deriva la morfología de los materiales mesoporosos. Finalmente se han extraído compuestos de benzalconio en muestras acuosas ambientales para evaluar el comportamiento de estos materiales cuando se aplican a problemas reales.

2.2.1. Síntesis y características del material MSU-1

El grupo de Pinnavaia⁽⁴⁾ describió la síntesis de la familia de sólidos genéricamente denominadas MSU-X, donde MSU hace referencia a la Michigan State University y el dígito X indica el tipo de tensioactivo utilizado: El dígito 1 corresponde a tensioactivos de tipo tergitol.

La síntesis del MSU-1 utilizado en este trabajo se realizó a partir de tergitol 15-S-12 y tetraortosilicato (ver estructuras en Figura 7), de acuerdo al procedimiento previamente descrito.⁽⁵⁾ El material resultante es un sólido síliceo que tiene poros de unos 3 nm de diámetro y una superficie específica de 1005 m² g⁻¹, presenta una estructura ordenada de canales hexagonales interconectados que se ha denominado de “agujero de gusano” (Figura 8).

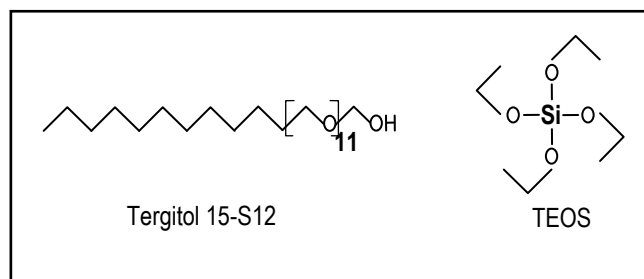


Figura 7: Estructura del Tergitol 15-S-12 y tetraetilortosilicato (TEOS)

[4] S.A. Bagshaw, E. Prouzet, T.J. Pinnavaia, *Science* 269 (1995) 1242

[5] E. Prouzet, T.J. Pinnavaia, *Angew.Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1997) 516

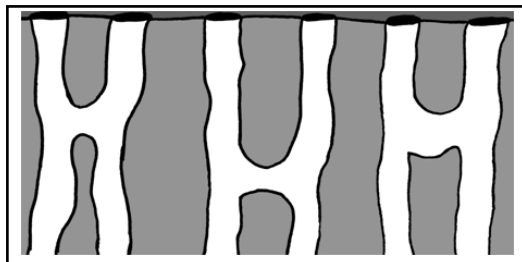


Figura 8: Estructura de los materiales MSU-X

Estos materiales mesoporosos son, no obstante, menos ordenados que los obtenidos mediante tensioactivos iónicos aunque presentan un intervalo de diámetros de poro más estrecho, paredes más delgadas y un alto grado de condensación que le confiere una gran estabilidad térmica.

2.2.2. Evaluación de la capacidad de adsorción de MSU-1

El sólido mesoporoso seleccionado como adsorbente es un material silíceo y por tanto dispone de grupos silanoles en su superficie. Como resultado ofrece la posibilidad de retención de compuestos basada en interacciones iónicas y puentes de hidrógeno. Adicionalmente, la estructura porosa derivada de los agregados micelares que sirvieron para la creación de la misma, actúa como una plantilla en la que sustancias anfífilas se adsorben reconstituyendo los agregados y proporcionando interacciones de dispersión entre las cadenas hidrocarbonadas que favorecen su adsorción.

La evaluación de la capacidad de adsorción se realizó mediante experimentos en batch, seleccionando grupos de analitos que pueden interactuar con el adsorbente mediante formación de puentes de hidrógeno (fenoles y herbicidas fenilurea), interacciones iónicas (los herbicidas diquat y paraquat) y un adicional efecto plantilla (tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos).

Los resultados obtenidos indican que en la adsorción por puentes de hidrógeno, la capacidad de retención aumenta a medida que lo hace la hidrofobicidad del compuesto, mientras las interacciones iónicas son muy energéticas y los compuestos con carga positiva se retienen cuantitativamente. La retención de los tensioactivos catiónicos y no iónicos es muy elevada indicando un mecanismo de adsorción adicional basada en la formación de agregados

supramoleculares dentro de los poros. La adsorción es independiente de la concentración de sales en la disolución para todos los analitos investigados en el intervalo 0-1 M de NaCl.

La capacidad de retención de los diferentes analitos en MSU-1 se evaluó mediante la determinación del volumen de ruptura en experimentos convencionales de SPE utilizando diferentes cantidades de adsorbente (0,1-0,5 g). Los mismos experimentos se realizaron utilizando sílice comercial para evaluar la influencia en SPE de la estructura porosa de MSU-1.

Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados más relevantes obtenidos para los diferentes compuestos para extracciones basadas en puentes de hidrógeno e interacciones iónicas respectivamente. Asimismo, en cada caso se contemplan efectos plantilla para los tensioactivos no iónicos e iónicos cuando se usa MSU-1.

Tabla 3: Datos más relevantes sobre volumen de ruptura en extracciones basadas en puentes de hidrógeno

Adsorbente	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volumen de muestra (mL)	Recuperación \pm S (%)			
			^d P	^d 4-CP	^d 2,4-DCP	^d 2,4,6-TCP
^a MSU-1	100	100	51 \pm 3	74 \pm 2	77 \pm 1	80 \pm 2
	100	200	26 \pm 2	54 \pm 3	65 \pm 2	70 \pm 1
	1	200	24 \pm 2	57 \pm 2	67 \pm 2	72 \pm 3
^a Sílice	100	50	^e nd	^e nd	7 \pm 1	25 \pm 1
	1	50	^e nd	^e nd	^e nd	^e nd
^b MSU-1	100	100	^d CT	^d IP	^d CX	
	100	100	78 \pm 2	77 \pm 3	80 \pm 2	
^b Sílice	100	100	37 \pm 2	30 \pm 2	38 \pm 3	
^c MSU-1	100	100	C ₁₀ (EO) ₃	C ₁₂ (EO) ₁₀	C ₁₄ (EO) ₄	
	100	100	99 \pm 4	100 \pm 3	96 \pm 4	
	100	500	48 \pm 3	45 \pm 2	49 \pm 3	
^b Sílice	100	200	17 \pm 5	42 \pm 4	48 \pm 3	

^a 0.5 g ^b0.1 g

^c Máxima adsorción en batch usando 0.5 g de MSU-1: P=49.2 \pm 2; 4CP=75 \pm 2; 2,4-DCP=79 \pm 2; 2,4,6-TCP=81 \pm 2; CT=79 \pm 3; IP=76 \pm 2; CX=80 \pm 2

^d No detectado

Los resultados obtenidos indican que en el caso de fenoles, el rendimiento de la extracción aumenta a medida que lo hace la hidrofobicidad del compuesto, mientras que se mantiene prácticamente constante para los herbicidas fenilurea, probablemente debido a que poseen mayor número de grupos donadores de protones (Tabla 3). El rendimiento de extracción para estos compuestos disminuye drásticamente cuando el material adsorbente es sílice, lo que se explica por su menor área superficial. Ya que el volumen de ruptura para MSU-1 es inferior a 100 mL para este tipo de compuestos (Tabla 3), su utilidad en SPE basada en interacciones por puentes de hidrógeno estará restringida a muestras para las que no se requiera elevada preconcentración.

Los resultados obtenidos para analitos que son retenidos mediante interacciones iónicas (Tabla 4) indican que debido a su elevada solubilidad en agua, el volumen de ruptura es de alrededor de 50 mL y que la sílice se comporta de manera similar a MSU-1 para cantidades de adsorbente de 0,5 g. Sólo en el caso de utilizar cantidades reducidas de adsorbente, MSU-1 es claramente superior a la sílice debido a su mayor área superficial. Al igual que en la SPE de compuestos retenidos mediante puentes de hidrógeno, MSU-1 está indicado para extracciones de compuestos iónicos en aplicaciones en que se requiera factores medios de preconcentración.

El efecto plantilla de la estructura mesoporosa de MSU-1 sobre el rendimiento de la extracción puede comprobarse claramente en los resultados mostrados para tensioactivos no iónicos y catiónicos en las Tablas 3 y 4 comparados con los obtenidos para sílice. Son suficientes 0,1 g de MSU-1 para obtener recuperaciones cuantitativas de tensioactivos catiónicos cuando se filtran 500 mL de muestra (Tabla 4). El volumen de ruptura para tensioactivos no iónicos (100 mL) se reduce en comparación con los tensioactivos catiónicos debido a que el enlace por puentes de hidrógeno es menos energético que la interacción electrostática. Sin embargo, la SPE en MSU-1 es claramente superior a cuando se usa sílice como adsorbente.

La conclusión principal de este estudio es que los materiales mesoporosos síliceos son excepcionales adsorbentes para compuestos anfífilos con grupos polares catiónicos.

Tabla 4: Datos más relevantes sobre volumen de ruptura en extracciones basadas en interacciones iónicas

Adsorbente	Volumen (mL)	Recuperación \pm S (%)					
		^d DQ	^d PQ	^e C ₈ -LAS	^e C ₁₀ -C ₁₃ LAS		
^a MSU-1	50	94 \pm 1	98 \pm 2				
	100	69 \pm 1	68 \pm 1				
	200	19 \pm 1	21 \pm 1				
	500			63 \pm 2	64 \pm 3		
^a Sílice	50	88 \pm 2	86 \pm 2				
	100	59 \pm 1	46 \pm 3				
	200	20 \pm 1	13 \pm 2				
	500			45 \pm 1	41 \pm 1		
^b MSU-1	50	95 \pm 2	97 \pm 2				
	100	56 \pm 1	49 \pm 1				
	200	16 \pm 1	24 \pm 1				
^b Sílice	50	71 \pm 2	67 \pm 2				
	100	35 \pm 1	28 \pm 1				
	200	^g nd	^g nd				
		^f BDDAB	^f BTDAB	^f BHDAC	^f DTAB	^f TTAB	^f HTAB
^b MSU-1	100	101 \pm 2	103 \pm 3	99 \pm 2	98 \pm 3	96 \pm 3	99 \pm 3
	250	98 \pm 2	100 \pm 2	97 \pm 3	101 \pm 1	97 \pm 2	96 \pm 3
	500	94 \pm 3	97 \pm 2	98 \pm 1	97 \pm 3	99 \pm 2	100 \pm 1
^b Sílice	100	88 \pm 3	95 \pm 3	98 \pm 3	83 \pm 2	91 \pm 3	93 \pm 2
	250	77 \pm 1	85 \pm 2	95 \pm 3	74 \pm 1	82 \pm 2	90 \pm 3
	500	33 \pm 1	38 \pm 1	42 \pm 1	21 \pm 1	26 \pm 1	34 \pm 1
^c MSU-1	100	99 \pm 3	100 \pm 2	99 \pm 3	103 \pm 3	102 \pm 2	99 \pm 3
	250	99 \pm 3	97 \pm 2	102 \pm 3	99 \pm 2	102 \pm 2	100 \pm 3
	500	100 \pm 2	101 \pm 3	99 \pm 2	96 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 3
^c Sílice	100	80 \pm 1	87 \pm 2	91 \pm 2	74 \pm 1	83 \pm 2	87 \pm 2
	250	27 \pm 1	30 \pm 1	40 \pm 1	24 \pm 1	31 \pm 1	52 \pm 2
	500	16 \pm 1	18 \pm 1	30 \pm 1	14 \pm 1	16 \pm 1	27 \pm 1

^a0.5 g ^b0.2 g ^c0.1 g

Concentración: ^d 500 mg L⁻¹; ^e 100 mg L⁻¹; ^f 20 mg L⁻¹; ^g No detectado

2.2.3. Evaluación de la capacidad de adsorción de MSU-1 funcionalizado con micelas cilíndricas de tensioactivos no iónicos y catiónicos

La funcionalización de MSU-1 con micelas cilíndricas de tensioactivos es muy simple y se consigue poniendo en contacto el material síliceo con una disolución de tensioactivos no iónicos o catiónicos a concentraciones de anfifilo correspondientes a la región 1 de la isoterma de adsorción correspondiente. En la Figura 9 se muestran las isotermas para bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) y [C₁₂(EO)₁₀]. A concentraciones de tensioactivo en disolución cercanas a la concentración micelar crítica (cmc) se alcanza saturación en la adsorción del

tensioactivo sobre MSU-1. A concentraciones inferiores de anfífilo existirán grupos silanoles libres sobre la superficie de MSU-1 para el establecimiento de interacciones por puentes de hidrógeno e iónicas. Las micelas cilíndricas proporcionan un ambiente hidrófobo dentro de la estructura porosa.

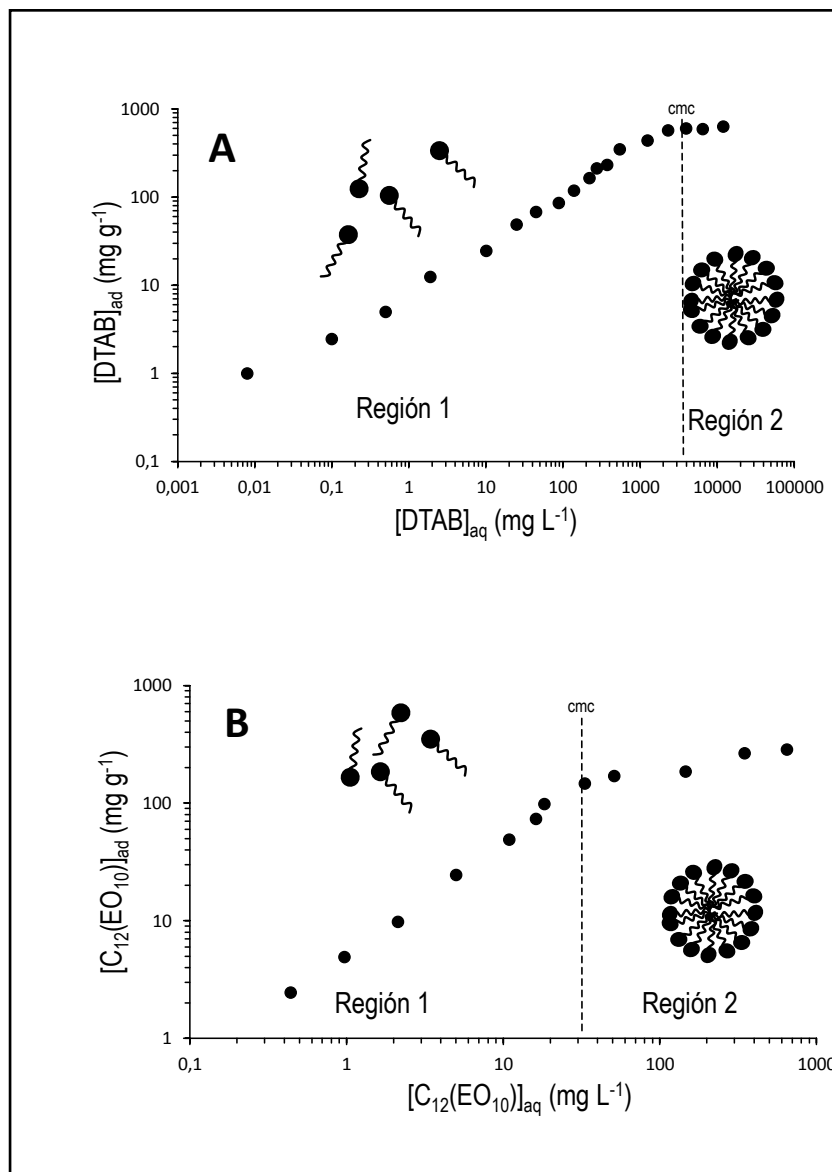


Figura 9: Adsorción de tensioactivos sobre el material MSU-1

La Tabla 5 muestra las recuperaciones obtenidas para MSU-1 funcionalizado con micelas de DTAB a concentraciones de anfifilo en disolución cercanas a la cmc. El microambiente hidrófobo proporcionado por las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo ofrece un mecanismo adicional de solubilización para fenoles y fenilureas que facilita su extracción cuantitativa aumentando así de forma importante el rendimiento de la extracción comparado con MSU-1 sin funcionalizar. Como es lógico, el rendimiento para paraquat y diquat se reduce drásticamente ya que las cargas superficiales de MSU-1 se han neutralizado con el DTAB.

Tabla 5: Recuperaciones y desviaciones estándar ($n=3$) para la SPE de los compuestos seleccionados sobre MSU-1 funcionalizado con micelas cilíndricas

Sorbente (g)	Muestra (mL)	Recuperación \pm desviación estándar(%)				
		Phenol	4-CP	2,4-DCP	2,4,6-TCP	
0.5	100	76 \pm 3	100 \pm 1	98 \pm 2	104 \pm 3	
		DQ	PQ			
0.5	100	19 \pm 2	20 \pm 1			
		CT	IP	CX		
0.5	100	99 \pm 3	101 \pm 2	97 \pm 2		
		C ₁₀ (EO) ₃	C ₁₂ (EO) ₁₀	C ₁₄ (EO) ₄		
0.1	100	99 \pm 2	104 \pm 1	99 \pm 1		
		BDDAB	BTDAB	BHDAC	TTAB	HTAB
0.1	500	101 \pm 3	99 \pm 2	100 \pm 2	102 \pm 1	101 \pm 2
		C ₈ -LAS	C ₁₀₋₁₃ -LAS			
0.5	500	99 \pm 3	101 \pm 2			

2.2.4. Extracción de compuestos de benzalconio en muestras de agua de río y residual usando el sólido mesoporoso MSU-1

La aplicabilidad de MSU-1 se evaluó mediante el análisis de aguas procedentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) de Mengíbar y Bailén (Jaén) recogidas en ambos casos tanto a la entrada (influentes)

como a la salida (efluentes). Se estima que la fuente más importante del influente en las aguas residuales de la localidad de Mengíbar es el componente doméstico, mientras que las aguas residuales de Bailén son de procedencia mixta, correspondiendo un porcentaje de entre el 20 y 40 a fuentes industriales, principalmente fabricación de ladrillos y producción de aceite de oliva. Un segundo tipo de agua analizada fue agua del río Guadalquivir a su paso por la provincia de Jaén a 1 Km aproximadamente aguas abajo del vertido de una industria papelera. Un esquema del proceso analítico seguido se muestra en la Figura 10.

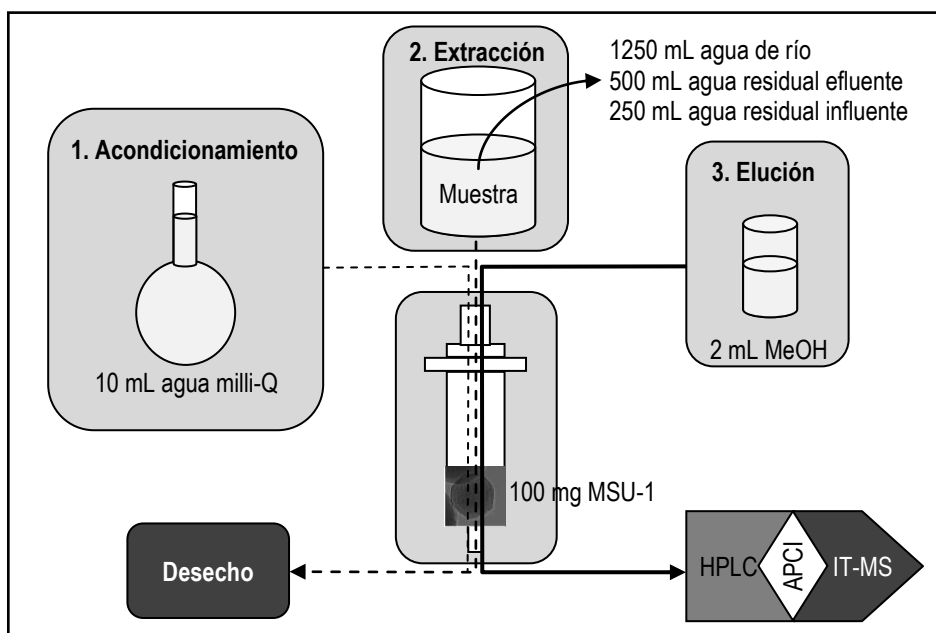


Figura 10: SPE con sólido mesoporoso para extraer BAS en aguas ambientales

Las principales características analíticas del método están recogidas en la Tabla 6, y los resultados obtenidos en análisis de las muestras de aguas ambientales se muestran en la Tabla 7. Estos resultados indican que el método es válido para la determinación de BAS en muestras complejas. Asimismo, permiten predecir que los materiales mesoporosos silíceos son adsorbentes prometedores para la determinación de contaminantes prioritarios y emergentes con propiedades anfífilas.

Tabla 6: Características analíticas del método

Parámetro	Analito			
	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	
LoD (ng L ⁻¹)	Influyente	8	8	8
	Efluente	4	4	4
	Río	1,6	1,6	1,6
RSD (%)	3,62	5,61	4,14	

Tabla 7: Concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$) y recuperaciones (%), y desviaciones estándar^a, de BAS in en muestras de aguas residuales y de río

Sample location	BDDAB	BTDA B	BHDAC
Agua residual influyente ^b			
Mengíbar	9.1±0.6	4.1±0.3	0.47±0.08
	101±5	98±6	99±4
Bailén	24±2	12±1	2.3±0.2
	95±3	94±5	99±4
Agua residual efluente ^c			
Mengíbar	0.49±0.05	0.36±0.03	<LOD
	95±6	94±3	96±4
Bailén	1.9±0.1	0.38±0.02	<LOD
	98±6	99±6	101±5
Agua de río ^d			
Guadalquivir	0.12±0.01	<LOD	<LOD
	97±4	93±5	95±2

^a n=3; nivel de fortificación: ^b10 $\mu\text{g L}^{-1}$, ^c5 $\mu\text{g L}^{-1}$, ^d1 $\mu\text{g L}^{-1}$
<LOD: menor que el límite de detección

3. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES

En las investigaciones relacionadas con el uso de disolventes supramoleculares que se desarrollan en esta memoria se utilizaron tres formatos de extracción (Figura 11). Las muestras sólidas se extrajeron con una mezcla inmisible de disolvente supramolecular/disolución acuosa de equilibrio (extracción líquido-líquido-sólido, LLSE) o utilizando directamente el disolvente supramolecular (extracción líquido-sólido, LSE) una herramienta recientemente desarrollada por nuestro grupo de investigación⁽¹⁾. En la extracción de muestras acuosas se aplicó por vez primera el uso de disolventes supramoleculares a la microextracción en una gota (SDME).

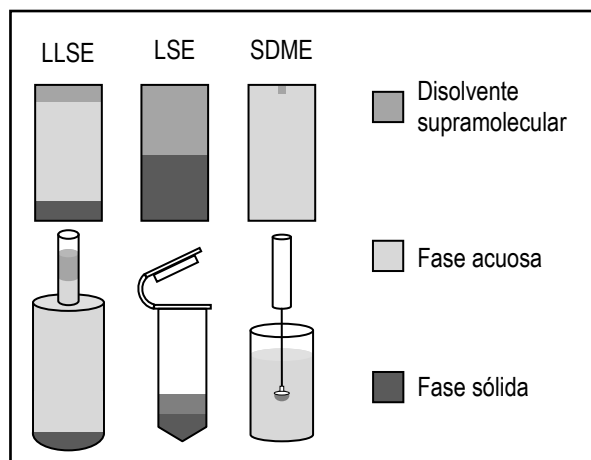


Figura 11: Representación esquemática de la distribución de fases en extracciones con disolventes supramoleculares y sus correspondientes formatos

El formato LLSE se aplicó a la extracción de aditivos prohibidos en alimentos, concretamente los colorantes Sudán I-IV en salsas con chile rojo. Para ello se empleó un tubo diseñado especialmente para este tipo de extracciones por nuestro grupo de investigación y fabricado por la empresa Pobel. El tubo, cuyo dibujo puede observarse en la Figura 11, es un cono de centrífuga cuya zona superior se ha estrechado, para una mejor medida y recuperación del volumen de coacervado.

El formato LSE implica el empleo de un disolvente supramolecular previamente sintetizado añadido directamente a una muestra sólida (sedimentos, carnes y pescados ahumados, mejillones y papilla para bebés) para extraer

compuestos estrogénicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos. La extracción se llevó a cabo en tubos plásticos de tipo *ependorf*.

Por último la microextracción en una gota de disolvente supramolecular permitió el análisis de clorofenoles tras su extracción en muestras acuosas ambientales. Para ello, la gota de disolvente supramolecular, como es tradicional en este formato, se suspendió en la punta de una jeringa.

3.1. Extracción líquido-líquido-sólido de colorantes Sudán en salsas con chile

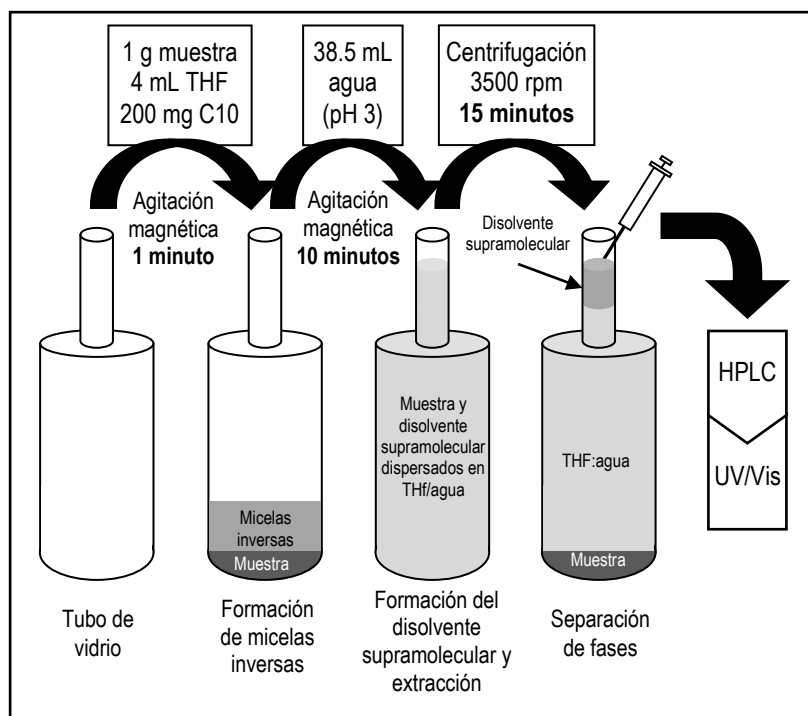


Figura 12 Esquema de la extracción con el sistema bifásico disolvente supramolecular:agua/THF

La extracción de colorantes Sudán(I, II, III y IV) se llevó a cabo utilizando un sistema extractante constituido por dos fases líquidas inmiscibles; un disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido decanoico y la disolución de equilibrio (THF:agua) generada durante la producción del mismo. En estos sistemas, el disolvente actúa como extractante y la fase acuosas o hidroorgánica se usa para eliminar interferencias. Una vez llevada a cabo la extracción de los

compuestos de interés, se determinaron los mismos mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector ultravioleta/visible. El esquema general del método se muestra en la Figura 12 y, a continuación, se discuten los factores y resultados más relevantes.

3.1.1. Características del disolvente supramolecular

El ácido decanoico se disuelve en tetrahidrofurano formando micelas inversas siguiendo un modelo de auto ensamblaje de tipo secuencial con, al menos, tres concentraciones críticas de agregación (4.8 ± 0.2 , 7.6 ± 0.4 y 51 ± 2 mM). La incorporación de agua a este sistema binario causa la desolvatación parcial de los agregados micelares previamente formados facilitando así la interacción entre ellos y la formación de micelas inversas de mayor tamaño que se separan de la fase formada por la mezcla de agua y tetrahidrofurano mediante un proceso de coacervación para dar lugar a una nueva fase líquida inmisible. En la Figura 13 se muestra el diagrama de fases del ácido decanoico en el sistema binario tetrahidrofurano:agua. Cuando se superan los límites señalados se produce la disolución o precipitación del ácido decanoico. Una microfotografía del disolvente supramolecular obtenido a partir de la coacervación de micelas inversas de ácido decanoico en tetrahidrofurano:agua se muestra también en la Figura 13.

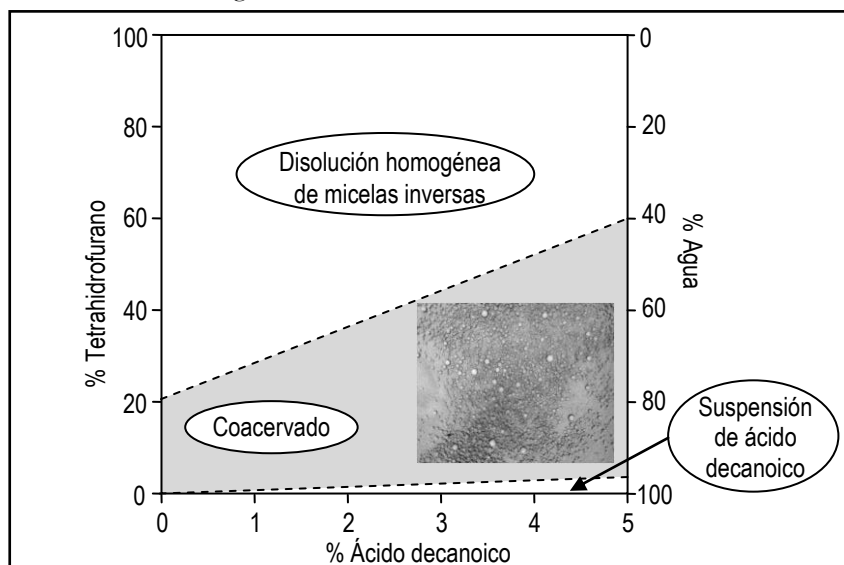


Figura 13: Diagrama de fases del ácido decanoico en agua:tetrahidrofurano y microfotografía del disolvente supramolecular formado

Como puede observarse en la Figura 14a, el volumen de disolvente obtenido en la síntesis presenta una relación lineal con la cantidad de ácido decanoico presente en la disolución inicial, independientemente de cuál sea la cantidad de tetrahidrofurano que se haya empleado, lo que indica que la composición del disolvente supramolecular se mantiene constante cuando el resto de variables no cambia. El volumen obtenido de disolvente no se modifica en la presencia de la matriz de las muestras analizadas.⁽⁶⁾

La Figura 14b muestra la relación exponencial que existe entre el volumen de disolvente supramolecular obtenido y el porcentaje de tetrahidrofurano empleado. Esta relación se ajusta a la ecuación $y = b_0e^{(bx)}$, donde y es el volumen de disolvente supramolecular obtenido (en μL) y x el porcentaje de tetrahidrofurano e indica que a medida que aumenta la proporción de tetrahidrofurano presente en la mezcla de síntesis, este se va incorporando de forma creciente al disolvente supramolecular, lo que puede observarse en el hecho de que el disolvente obtenido es cada vez menos viscoso. En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de la muestra, por lo que puede estimarse el volumen de coacervado que va a obtenerse en el proceso de extracción propuesto, a partir de la ecuación $y = 1.06e^{(0.04731z)}$.

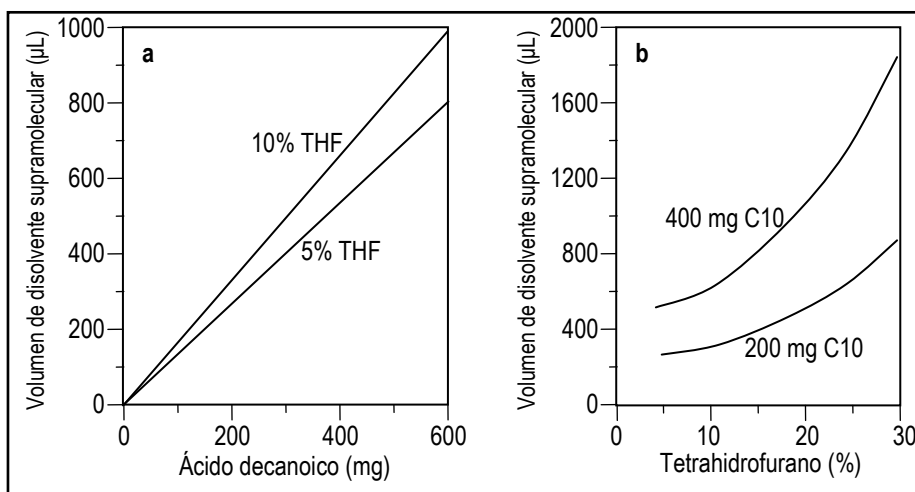


Figura 14: Dependencia del volumen de disolvente supramolecular obtenido en función de (a) la cantidad de ácido decanoico añadido y (b) del porcentaje de tetrahidrofurano.

[6] A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.

3.1.2. Muestras

Se seleccionaron tres tipos de salsas que contenían chile: salsa de tomate, salsa de vinagre (tipo tabasco, en la que el chile es macerado en el vinagre) y salsa para condimentar carnes. El chile es un ingrediente común entre los alimentos procedentes de Asia en los que se ha detectado la presencia de colorantes Sudán. De cada tipo de salsa se adquirieron muestras correspondientes a dos marcas comerciales que se seleccionaron de modo aleatorio a partir de las marcas disponibles en supermercados de Córdoba. La composición estimada en grasas, proteínas, hidratos de carbono y cantidad de chile de cada uno de los tipos de muestra estudiados se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Principales componentes de los alimentos analizados para la determinación de colorantes de tipo Sudán

Tipo de Muestra	Componentes (g100g ⁻¹ alimento)			
	Grasas	Proteínas	Carbohidratos	Chile
Salsa de tomate	0	1.4	18	0.5
Salsa de vinagre	0	0.29	0.59	28
Salsa para carne	2.4	2.1	8.6	1

En ninguna de las muestras analizadas se encontraron los colorantes Sudán a niveles detectables. Las muestras se fortificaron a dos niveles (2 y 5 veces el límite de cuantificación del método) para estimar el efecto de las diferentes matrices en la recuperación. El resultado puede verse en la Tabla 9.

3.1.3. Extracción

El método de extracción propuesto implica la adición a la muestra de los ingredientes necesarios para la formación in situ del disolvente supramolecular. Este proporciona dos tipos de interacciones para la solubilización de los colorantes Sudán: fuerzas de van der Waals en las cadenas hidrocarbonadas del ácido decanoico y puentes de hidrógeno en los grupos polares del mismo. La cantidad de ácido decanoico y porcentaje de THF a partir de los cuales se forma el disolvente supramolecular influyen decisivamente en la eficacia de la extracción y en los límites de cuantificación del método (Figura 15). A medida que aumenta la cantidad de ácido decanoico y THF en el medio se produce más disolvente y aumenta la eficacia de extracción, pero disminuye el límite de cuantificación.

Tabla 9. Recuperaciones \pm desviaciones estándar (%) de muestras fortificadas

Muestra	Marca	Nivel de fortificación	Sudán I	Sudán II	Sudán III	Sudán IV
Salsa de tomate	1	2xMQL	89 \pm 4	86 \pm 2	86 \pm 3	92 \pm 4
		5xMQL	87 \pm 3	96 \pm 5	96 \pm 2	108 \pm 7
	2	2xMQL	94 \pm 5	89 \pm 5	96 \pm 5	94 \pm 2
		5xMQL	86 \pm 2	89 \pm 4	95 \pm 5	90 \pm 3
Salsa de vinagre	1	2xMQL	101 \pm 7	99 \pm 3	89 \pm 3	100 \pm 5
		5xMQL	92 \pm 4	85 \pm 3	90 \pm 4	91 \pm 4
	2	2xMQL	97 \pm 5	102 \pm 7	96 \pm 6	98 \pm 5
		5xMQL	86 \pm 4	87 \pm 3	100 \pm 4	99 \pm 4
Salsa de carne	1	2xMQL	106 \pm 7	100 \pm 4	90 \pm 3	86 \pm 3
		5xMQL	97 \pm 3	99 \pm 3	91 \pm 4	92 \pm 4
	2	2xMQL	86 \pm 4	104 \pm 5	97 \pm 4	103 \pm 6
		5xMQL	88 \pm 5	91 \pm 3	90 \pm 5	100 \pm 5

Dado que el uso de los colorantes Sudán como aditivos alimentarios está prohibido en la legislación europea es muy importante la detección de los mismos a los menores niveles posibles. Por esta razón, se utilizó como criterio de selección el límite de cuantificación, siempre que la recuperación de los diferentes colorantes fuera superior al 75 % (10 % THF y 200 mg de ácido decanoico). El equilibrio de distribución de los Sudán entre las muestras de salsa y el disolvente supramolecular se estableció rápidamente (\approx 10 min) y los colorantes apenas se solubilizaron en la disolución hidroorgánica en equilibrio con el disolvente supramolecular, dado el carácter hidrófobo de los mismos.

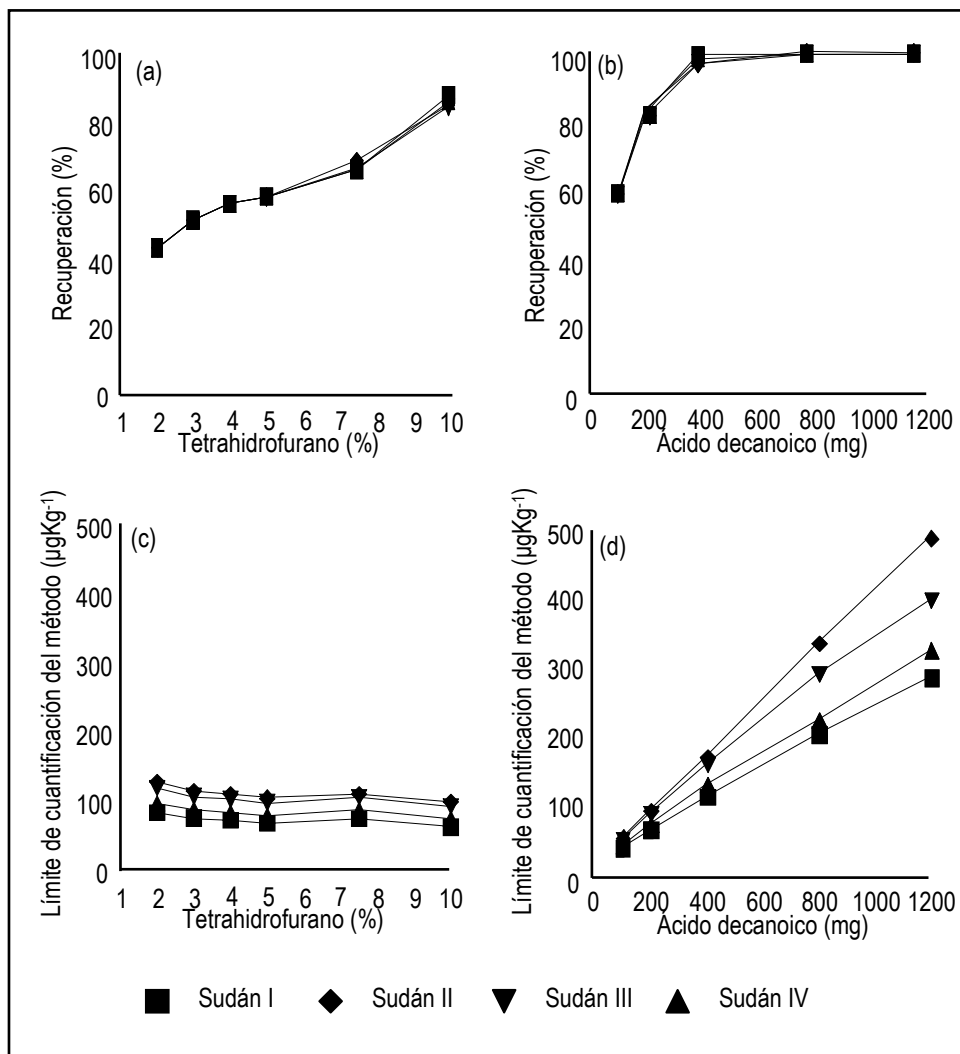


Figura 15 Efecto de la cantidad de (a y c) tetrahidrofurano y (b y d) ácido decanoico en (a y b) la recuperación de colorantes tipo Sudán y en (c y d) el límite de cuantificación del método.

3.1.4. Cuantificación

Una vez solubilizados los analitos en el disolvente supramolecular, se analizó una alícuota del mismo mediante inyección directa en un sistema cromatográfico acoplado con un detector fotométrico. Los cromatogramas obtenidos a partir de una disolución estándar de los colorantes y muestras de salsa fortificadas con los colorantes a concentraciones 2 y 5 veces el límite de cuantificación, se muestran en la Figura 16.

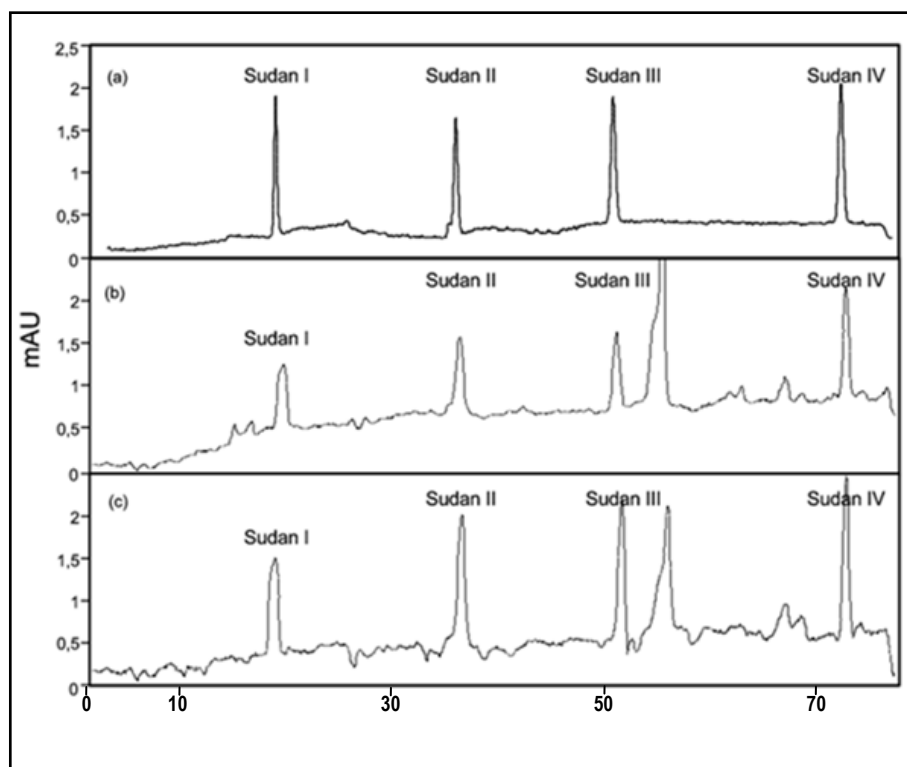


Figura 16: Cromatogramas obtenidos a partir de (a) una disolución estándar de colorantes Sudan y 1 g de (b) salsa de tomate y (c) salsa de vinagre fortificados con (b) 2 y (c) 5 veces el límite de cuantificación

Dado que no se lleva a cabo ninguna etapa de clean-up, la composición y el gradiente de elución de la fase móvil se seleccionaron para evitar la coelución de los componentes extraídos de la matriz de la muestra y el ácido decanoico. El elevado porcentaje inicial de disolvente orgánico en la fase móvil (70% de acetonitrilo) disolvió las micelas inversas de ácido decanoico y los monómeros resultantes no modificaron el desarrollo cromatográfico de los colorantes, como se aprecia en la Figura 16. El ácido decanoico eluyó a un tiempo de retención de 7 minutos. Después de cada desarrollo cromatográfico, la columna se limpió con 5 mL de THF (a 1 mL min^{-1}) para la elución de los compuestos más hidrófobos de la matriz de las muestras.

Las características analíticas del método propuesto para la determinación de los colorantes Sudán mediante cromatografía de líquidos y detección fotométrica se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Características analíticas del método

Analito	Sensibilidad \pm SD (AU ng ⁻¹)	Intervalo lineal (μ g Kg ⁻¹)	Coefficiente de correlación	MDL (μ g Kg ⁻¹)
Sudán I	4352 \pm 50	28-2000	0.9997	4.2
Sudán II	3293 \pm 35	42-2000	0.9997	2.7
Sudán III	3479 \pm 32	40-2000	0.9998	6.5
Sudán IV	3925 \pm 44	32-2000	0.9997	7.4

La calibración se llevó a cabo mediante la inyección de disoluciones de concentración creciente de los 4 colorantes analizados en acetonitrilo, una vez que se comprobó la no influencia de la matriz en la señal obtenida, dando como resultado unos buenos coeficientes de correlación.

Los límites de detección del método (calculados en base a una señal:ruido de 3 en 11 blancos) coinciden con los que se encuentran en la bibliografía (descritos entre 1 y 7 μ g Kg⁻¹) utilizando la misma técnica de detección (fotométrica), aunque se lleva a cabo una mejora sustancial en la etapa de tratamiento de la muestra en términos de reducción de tiempo y costes y compatibilidad con los principios de la química verde.

3.2. Extracción de sustancias estrogénicas en sedimentos fluviales

Se empleó un disolvente supramolecular formado por 1-decanol, tetrahidrofurano (THF) y agua que presenta características de material de acceso restringido para extraer y realizar el clean-up de una serie de sustancias con actividad estrogénica en muestras de sedimentos fluviales. Las sustancias de interés en este estudio fueron las hormonas naturales estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y estriol (E3), la hormona sintética 17 α -etinilestradiol (EE2) y el bisfenol A (BPA), que es una sustancia sintética de aplicación industrial con actividad estrogénica. La extracción, llevada a cabo mediante la adición del disolvente supramolecular directamente a la muestra, se combina con la detección mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, tal y como se resume en la Figura 17.

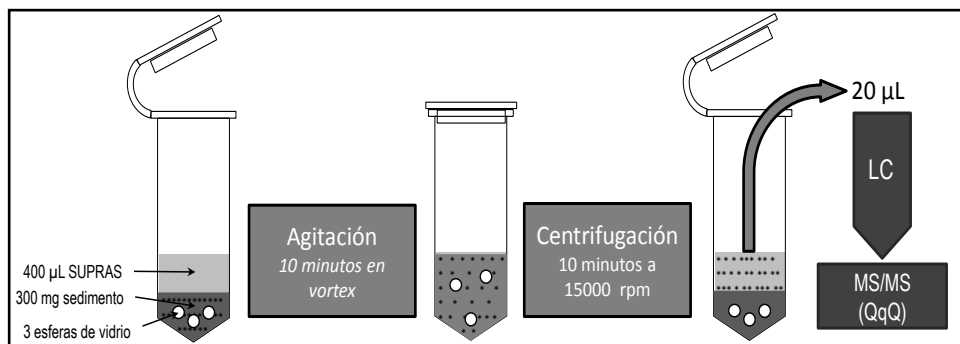


Figura 17: Procedimiento de extracción de sustancias estrogénicas presentes en sedimentos fluviales

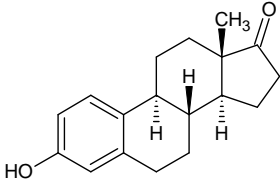
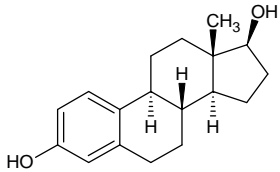
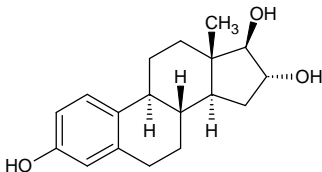
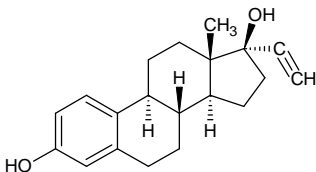
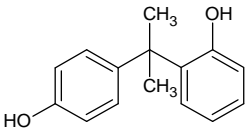
3.2.1. El disolvente supramolecular de 1-decanol/THF/agua

El 1-decanol forma micelas inversas en disoluciones de tetrahidrofurano. Al añadir agua se produce el autoensamblaje del 1-decanol que va formando pequeñas gotas de coacervado, las cuales, por coalescencia, van creciendo en tamaño y aglomerándose unas con otras hasta que la diferencia de densidad causa la separación de las fases.

Las moléculas del anfífilo forman estructuras hexagonales tanto a nivel nano- como microscópico que encierran cavidades acuosas, lo que proporciona diversos ambientes para la extracción. Además, el tamaño de estas cavidades y la composición del disolvente supramolecular pueden modificarse variando el ambiente en el que se produce el autoensamblaje, es decir, la relación THF:agua. De esta forma, el disolvente puede utilizarse para evitar la coextracción de macromoléculas procedentes de la matriz de la muestra, tales como ácidos húmicos o fúlvicos ya que el tamaño de las cavidades acuosas puede modificarse en un intervalo comprendido entre 0.05 y 0.5 µm cambiando la cantidad de tetrahidrofurano añadido para su formación entre el 10 y 60%.

Los analitos se solubilizan en el disolvente supramolecular mediante dos tipos de interacciones (Tabla 11): fuerzas de dispersión con las cadenas hidrocarbonadas del decanol ($\log K_{ow}$ para los analitos entre 2.5 y 4.1) y puentes de hidrógenos con los grupos alcohol del anfífilo (número de grupos donadores/aceptores de protones para los analitos entre 1 y 3)

Tabla11: Estructura y propiedades fisicoquímicas de interés de los analitos estudiados

Analito	Estructura	^a logK _{ow}	^a pK _a	^a H ⁺ aceptores/ donadores
Estrógenos naturales				
Estrona (E1)		3.62	10.25	2/1
17β-estradiol (E2)		4.15	10.27	2/2
Estriol (E3)		2.53	10.25	3/3
Estrógeno sintético				
17α-etinilestradiol (EE2)		4.11	10.24	2/2
Xenoestrógeno				
Bisfenol A (BPA)		3.64	10.29	2/2

^a Datos calculados tomados de <https://scifinder.cas.org>

3.2.2. Muestras

Se analizaron muestras de sedimentos fluviales procedentes de tres cauces en el entorno de la ciudad de Córdoba: los ríos Guadalquivir y Guadajoz y el arroyo de Rabanales en los emplazamientos que se muestran en la figura 18.

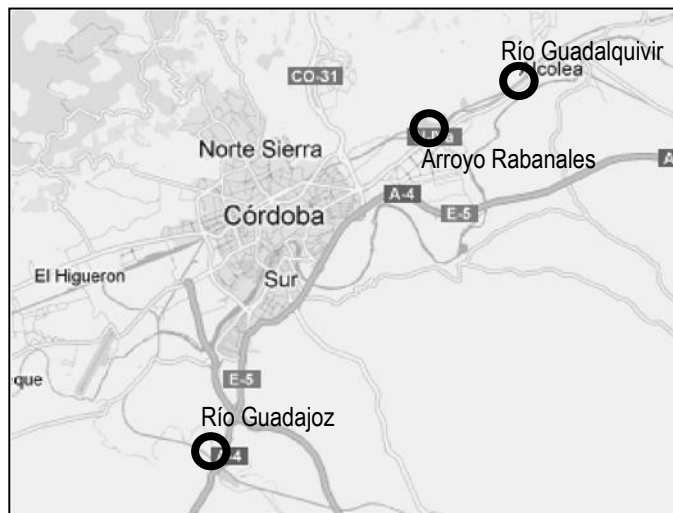


Figura 18: Situación aproximada de los puntos de muestreo

Se recogió parte de la fracción superficial hasta una profundidad aproximada de 5 cm que es fracción con mayor disponibilidad para los organismos acuáticos.

3.2.3. Extracción

El proceso de extracción se optimizó investigando variables relacionadas con el disolvente supramolecular tales como longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol así como el volumen y la composición. También se tuvieron en cuenta parámetros operacionales como la agitación necesaria para la extracción (tiempo e intensidad) y la temperatura, tomándose como indicadores los valores de recuperación y los límites de cuantificación del método. Para llevar a cabo dicha optimización se analizaron alícuotas de un sedimento sin cantidades detectables de los compuestos de interés fortificados a un nivel de 10 ng g^{-1} con cada uno de los analitos estudiados.

La influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada en el rendimiento de la extracción se evaluó mediante la extracción con alcoholes entre 7 y 14 átomos de carbono. Para ello se sintetizaron los respectivos disolventes supramoleculares a partir de un 3% del alcohol y un 20% de THF y se usaron volúmenes de 800 μL para llevar a cabo la extracción. Se obtuvieron resultados cuantitativos para la extracción de los analitos usando decanol y la eficacia disminuyó para los de mayor y menor longitud de cadena hidrocarbonada. Esto se debe a que las cadenas largas favorecen las fuerzas de dispersión mientras que las cortas favorecen los enlaces de hidrógeno, por lo que es lógico pensar que para longitudes intermedias, como es el caso del decanol, se produce una situación idónea para la extracción de los compuestos estudiados que presentan ambos tipos de interacciones. Además, el decanol tiene un tiempo de retención cromatográfico en el gradiente empleado que impide coeluciones que llevarían a una situación de supresión de señal.

Como se ha señalado anteriormente, la cantidad de THF empleado en la síntesis del disolvente supramolecular tiene una importancia capital, ya que de él depende tanto la composición como la estructura y, por tanto, va a afectar al modo en que se produce la extracción de los diferentes compuestos de interés. Para evaluarlo, se llevó a cabo la síntesis de disolventes supramoleculares que, manteniendo un 3% de 1-decanol, variaban su cantidad de THF entre un 5 y un 30%, usando 800 μL como volumen para llevar a cabo la extracción de alícuotas de sedimentos (300 mg) fortificadas con 10 ng g^{-1} de cada analito estudiado. Al aumentar la cantidad de tetrahidrofurano añadido para la síntesis del disolvente supramolecular, también lo hace el volumen formado, a medida que se incorpora más agua y más tetrahidrofurano, aunque éste lo hace cada vez en mayor proporción.

Tabla 12: Composición del disolvente supramolecular en base al THF añadido

%THF añadido (v/v)	Composición del disolvente (fracción en masa)			Volumen formado (mL)
	decanol	THF	agua	
5	0.798	0.166	0.036	3.4
10	0.689	0.261	0.050	4.1
15	0.590	0.346	0.064	4.9
20	0.499	0.422	0.079	5.8
25	0.418	0.488	0.093	7.0
30	0.344	0.548	0.108	8.4

Como puede observarse en la Tabla 12, la concentración de tensioactivo en el disolvente va haciéndose más pequeña a medida que aumenta el volumen y, con ello, la proporción de THF y agua. Sin embargo, la composición del disolvente supramolecular no afecta significativamente a la eficacia de la extracción, como puede observarse en la Tabla 13, teniendo en cuenta que se emplea el mismo volumen de extractante en todos los casos: 800 μ L. Finalmente, el disolvente supramolecular formado por un 68,9% de decanol, 26,1% de THF y 5% de agua (ver Tabla 12) fue el seleccionado para llevar a cabo las extracciones y la limpieza de la muestra. Se requiere un volumen de 0,4 mL de este disolvente para obtener recuperaciones cuantitativas.

Tabla 13: Eficacia de la extracción según la composición del disolvente supramolecular

%THF añadido (v/v)	Recuperación \pm S (%)				
	E1	E2	E3	EE2	BPA
5	91 \pm 6	76 \pm 4	95 \pm 5	80 \pm 4	93 \pm 4
10	98 \pm 2	98 \pm 3	102 \pm 2	103 \pm 4	100 \pm 2
15	99 \pm 7	98 \pm 2	99 \pm 2	101 \pm 3	102 \pm 2
20	105 \pm 2	99 \pm 4	99 \pm 6	103 \pm 3	100 \pm 7
25	100 \pm 9	104 \pm 7	98 \pm 1	97 \pm 5	102 \pm 3
30	104 \pm 5	99 \pm 4	99 \pm 2	103 \pm 8	99 \pm 6

El proceso de extracción clean-up es muy rápido; se requieren 10 minutos para la extracción/clean-up y 10 minutos para la separación del extracto no soluble mediante centrifugación.

3.2.4. Cuantificación

La cuantificación de los alteradores endocrinos seleccionados para el estudio se llevó a cabo usando un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo con el que se obtuvieron cromatogramas como los mostrados en la Figura 22. Para minimizar la contaminación del detector, se envió a desecho el flujo procedente de la columna en aquellos tiempos en los que no se esperaba un pico de interés, esto es, entre 0 y 5 minutos y de 7 a 10 minutos, tal y como se observa en la Figura 19.

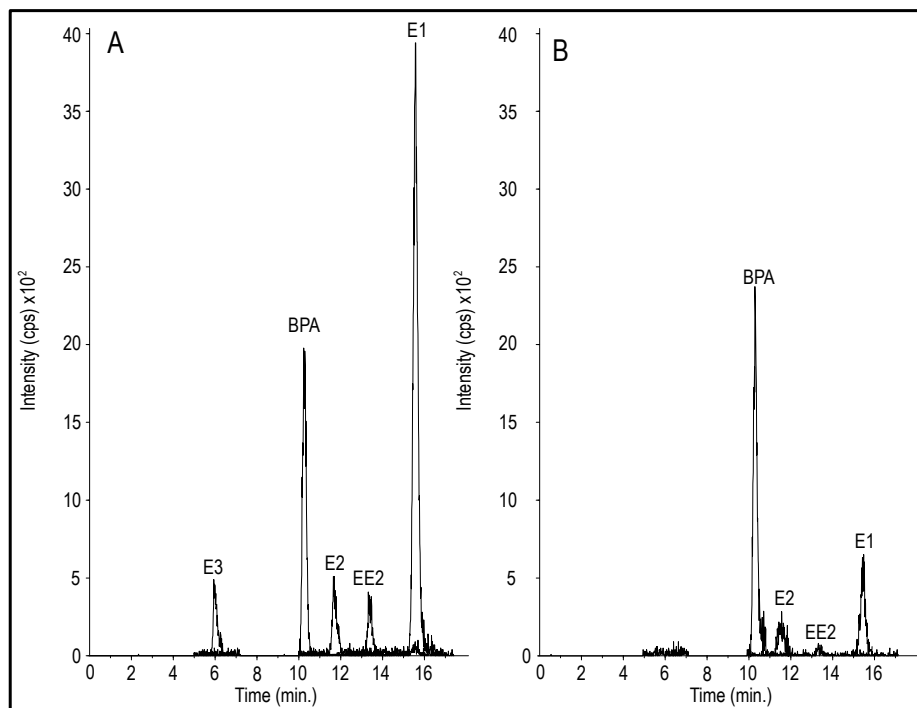


Figura 19: Cromatogramas correspondientes a A) un patrón de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y B) una muestra real de sedimento del arroyo Rabanales

Los patrones se prepararon en disolvente supramolecular. Para las curvas de calibrado obtenidas por regresión lineal con calibración ponderada del tipo $1/x$, se obtuvieron coeficientes de correlación en el intervalo comprendido entre 0,992 y 0,9992.

La precisión del método estuvo en el intervalo entre 1 y 9% para los diferentes analitos, con límites de detección y cuantificación para E1, E2, E3, EE2 y BPA de 0,03 y 0,09; 0,3 y 0,73; 0,28 y 0,68; 0,4 y 1,27 y 0,08 y 0,20 ng g^{-1} respectivamente.

3.3. Extracción líquido-sólido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en alimentos

La extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en alimentos se llevó a cabo mediante la adición directa del disolvente supramolecular a la muestra. Los hidrocarburos analizados fueron los 4 propuestos por las autoridades

europas como representativos de la contaminación por PAHs de los alimentos: benzo[*a*]antraceno (BaA), benzo[*b*]fluoranteno (BbF), criseno (CHR) y benzo[*a*]pireno (BaP). Una vez llevada a cabo la extracción de los PAHs, tal y como se muestra en la Figura 20, se procedió a la determinación de los mismos en el extracto del disolvente supramolecular mediante cromatografía de líquidos acoplada a detección fluorimétrica.

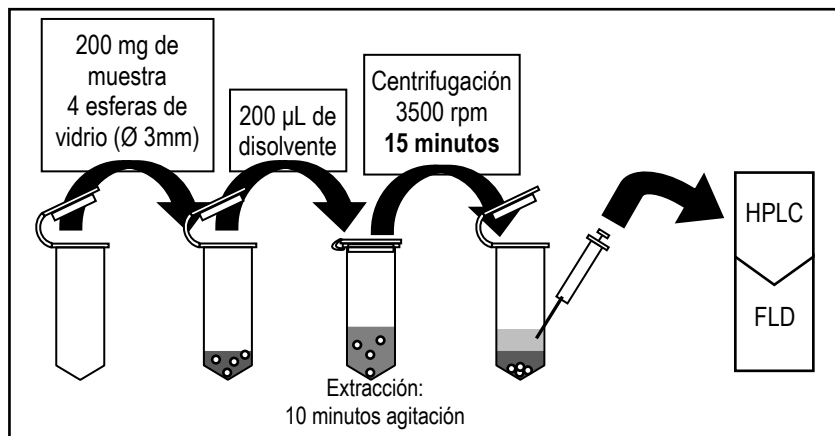


Figura 20: Esquema del procedimiento de extracción de los PAH4 con disolvente supramolecular de vesículas de ácido octanoico/octanoato

3.3.1. Síntesis y características del disolvente supramolecular

La síntesis del disolvente supramolecular se llevó a cabo mezclando en una disolución acuosa ácido octanoico e hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) en una proporción molar 2:1 (Figura 21).

El disolvente se forma instantáneamente y se separa de la disolución acuosa mediante centrifugación. Debido a su menor densidad puede ser recogido fácilmente usando una microjeringa para ser almacenado en viales, a temperatura ambiente. La relación molar (ácido carboxílico/tetrabutilamonio) en la que se produce coacervación va desde 10 a 0,3 aproximadamente (Figura 22), aunque se prefiere la relación 1:1 debido a la excepcional estabilidad de las vesículas formadas entre las moléculas de ácido octanoico y octanoato. Para esta relación se produce la máxima incorporación del tensioactivo al coacervado y, por tanto, el máximo rendimiento de la síntesis⁽⁷⁾.

[7] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 72 (2006) 7229.

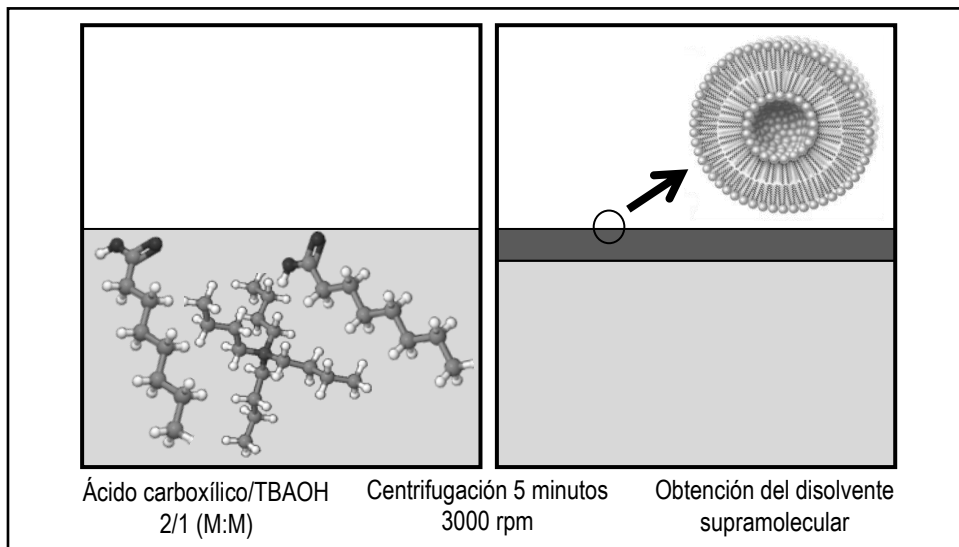


Figura 21: Síntesis del disolvente supramolecular de vesículas

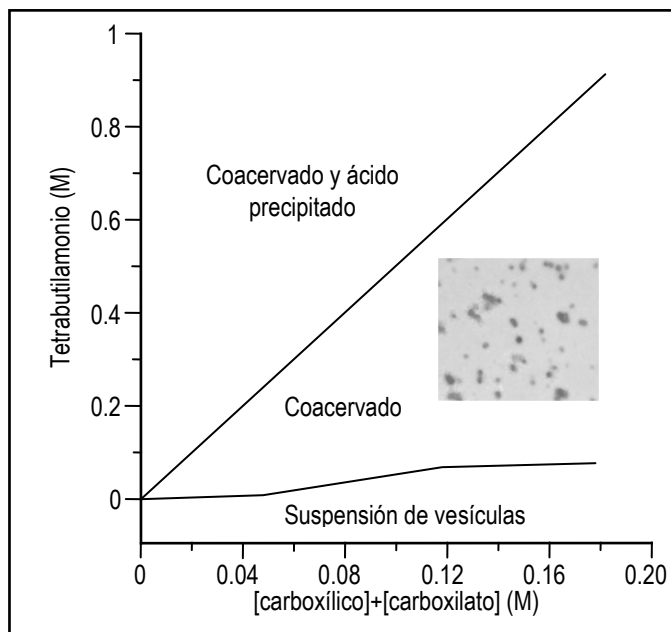


Figura 22 Diagrama de fases para mezclas ácido carboxílico/tetrabutylammonio en fase acuosa

El disolvente supramolecular formado por vesículas es producido en un intervalo de pH comprendido entre $pK_{\text{aparente}}-1$ y $pK_{\text{aparente}}+1$. El pK_{aparente} se define como aquél que tiene el ácido carboxílico cuando se encuentra introducido en una determinada estructura. Algunos ejemplos de este pK_a aparente serían 6, 7, 7,8, 7,9 y 8,5 para los ácidos octanoico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico y oleico respectivamente.

El volumen de disolvente supramolecular obtenido en esta síntesis es linealmente dependiente de la cantidad de ácido octanoico utilizado, siempre que se mantenga constante la proporción ácido/tetrabutylamonio en 2:1. Esto indica que la composición del disolvente supramolecular obtenido se mantiene constante. La pendiente de la relación lineal depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido carboxílico. Así, es $1,2 \pm 0,2 \mu\text{L mg}^{-1}$ para ácido octanoico y $1,3 \pm 0,2 \mu\text{L mg}^{-1}$ para ácido decanoico.

3.3.2. Muestras

Las muestras a las que se aplicó el método desarrollado se seleccionaron tomando como referencia la legislación europea que rige su control,⁽⁸⁾ de modo que se procuró cubrir la mayor parte de los alimentos legislados (Tabla 15). Así, se seleccionó un producto alimenticio destinado a niños de corta edad, dos muestras de carne de pescado ahumado (bacalao y salmón), dos de carnes ahumadas (pavo y lomo de cerdo) y un molusco bivalvo (mejillón, sin concha). Actualmente, la legislación europea tan solo limita la presencia de BaP en los alimentos, considerándolo como un indicador del contenido total de PAHs. Sin embargo, diferentes estudios realizados por indicación de la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA)^(9,10) han concluido que el BaP no es un indicador suficiente para la evaluación de la contaminación por PAHs y concluyen que el grupo constituido por BaA, BbF, CHR y BaP es un indicador más aceptable para esta evaluación.

[8] Directiva de la Unión Europea 2005/10/EC.

[9] European Food Safety Authority, Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, Parma, 2007.

[10] Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal* (2008) 724, 1-114

Tabla 15: Contenidos máximos permitidos para BaP en la legislación europea para los tipos de alimentos estudiados

Producto	Contenido máximo ($\mu\text{g Kg}^{-1}$ peso fresco)
Productos alimenticios destinados a lactantes y niños de corta edad	1
Carnes ahumadas y productos cárnicos ahumados	5
Carne de pescado ahumado y productos pesqueros ahumados, excluidos los moluscos bivalvos	5
Moluscos bivalvos	10

Antes de llevar a cabo la extracción, las muestras se homogeneizaron usando un homogeneizador tipo “ultraturrax” a potencia máxima (4500 rpm). Cuando las muestras no se analizaron de forma inmediata, éstas se congelaron a -20°C en porciones de 1 g.

3.3.3. Extracción

El método que se propone para la extracción de BaA, BbF, CHR y BaP en muestras de alimentos supone la mezcla directa de 200 μL de disolvente supramolecular (previamente sintetizado y almacenado) y 200 mg de muestra en un tubo eppendorf (Figura 20) que se coloca en un agitador tipo “vortex” durante 10 minutos a máxima potencia (aproximadamente 2500 rpm). Para favorecer el contacto y la disgregación de los componentes, se añaden 4 esferas de vidrio de 3 mm de diámetro. Una vez agitado y extraídos los PAHs de la muestra, el tubo es introducido en una ultracentrífuga a 15000 rpm durante 20 minutos para asegurar que las fases vuelvan a separarse y no queden partículas sólidas en suspensión. El disolvente supramolecular que contiene los PAHs se recupera con una microjeringa y se inyecta en el sistema cromatográfico.

El tiempo requerido para solubilización de los PAHs contenidos en la muestra de los alimentos fue de aproximadamente 10 min (Figura 23) lo que demuestra la gran capacidad de extracción del disolvente vesicular utilizado. Para extracción cuantitativa de los PAHs seleccionados se requirió utilizar un volumen de disolvente, en μL , igual a la cantidad de muestra analizada, en mg (Figura 24).

Por último y, una vez fijada la proporción 1:1 (m/v) como la más adecuada para llevar a cabo la extracción, en términos de recuperación, se estudió el efecto que tendría la variación de la cantidad de muestra en el intervalo entre 100 y 800 mg. Se encontró que las muestras fueron representativas en el intervalo considerado (Figura 25).

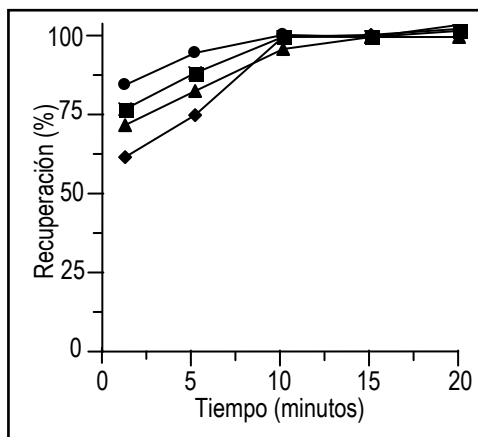


Figura 23: Efecto del tiempo en la extracción de los PAH4

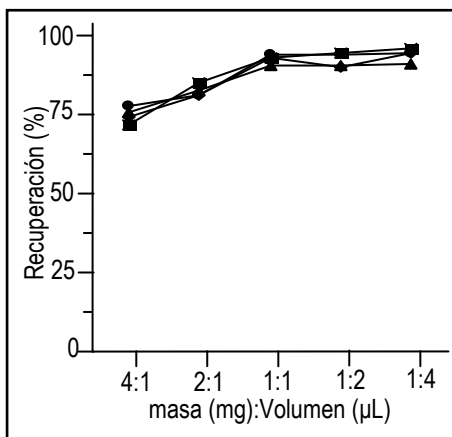


Figura 24: Efecto de la relación volumen de disolvente/muestra en la extracción de los PAH4

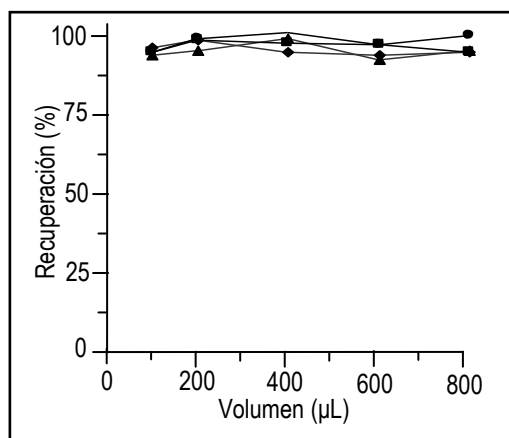


Figura 25: Efecto de la cantidad de muestra en la extracción de los PAH4

La gran capacidad de extracción del disolvente supramolecular utilizado para la extracción de los PAHs se debe probablemente a que pueden establecerse diferentes mecanismos de interacción, lo que facilita su solubilización. Así, pueden

establecerse enlaces tipo π -catión entre los electrones tipo π de los anillos aromáticos de los PAHs y el catión amonio del TBA; y por otro lado, pueden establecerse interacciones de dispersión entre las cadenas hidrocarbonadas del ácido octanoico y los propios analitos.

3.3.4. Cuantificación

Una alícuota del extracto formado por el disolvente supramolecular, los analitos de interés (BaA, BbF, BaP y CHR) y algunos elementos de la matriz, se inyectó para su análisis en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector fluorimétrico. En la Figura 26 pueden observarse algunos de los cromatogramas obtenidos en el análisis de disoluciones patrón y de extractos de muestras.

Las características analíticas que proporciona el método propuesto para la determinación de BaA, CHR, BaP y BbF en muestras de alimentos se detallan en la Tabla 16

Tabla 16: Características analíticas del método para la extracción de los PAH4 con un disolvente supramolecular en muestras de alimentos

Parámetro	BaA	CHR	BbF	BaP
Pendiente \pm SD (mV Kg μ g ⁻¹)	178647 \pm 687	71124 \pm 892	70297 \pm 1120	262904 \pm 3136
Linealidad (μ g Kg ⁻¹)	0,5-100	0,7-100	0,7-100	0,4-100
Límite de detección del método (μ g Kg ⁻¹)	0.1	0.2	0.2	0.1
Precisión RSD (%)	3	3	3	3

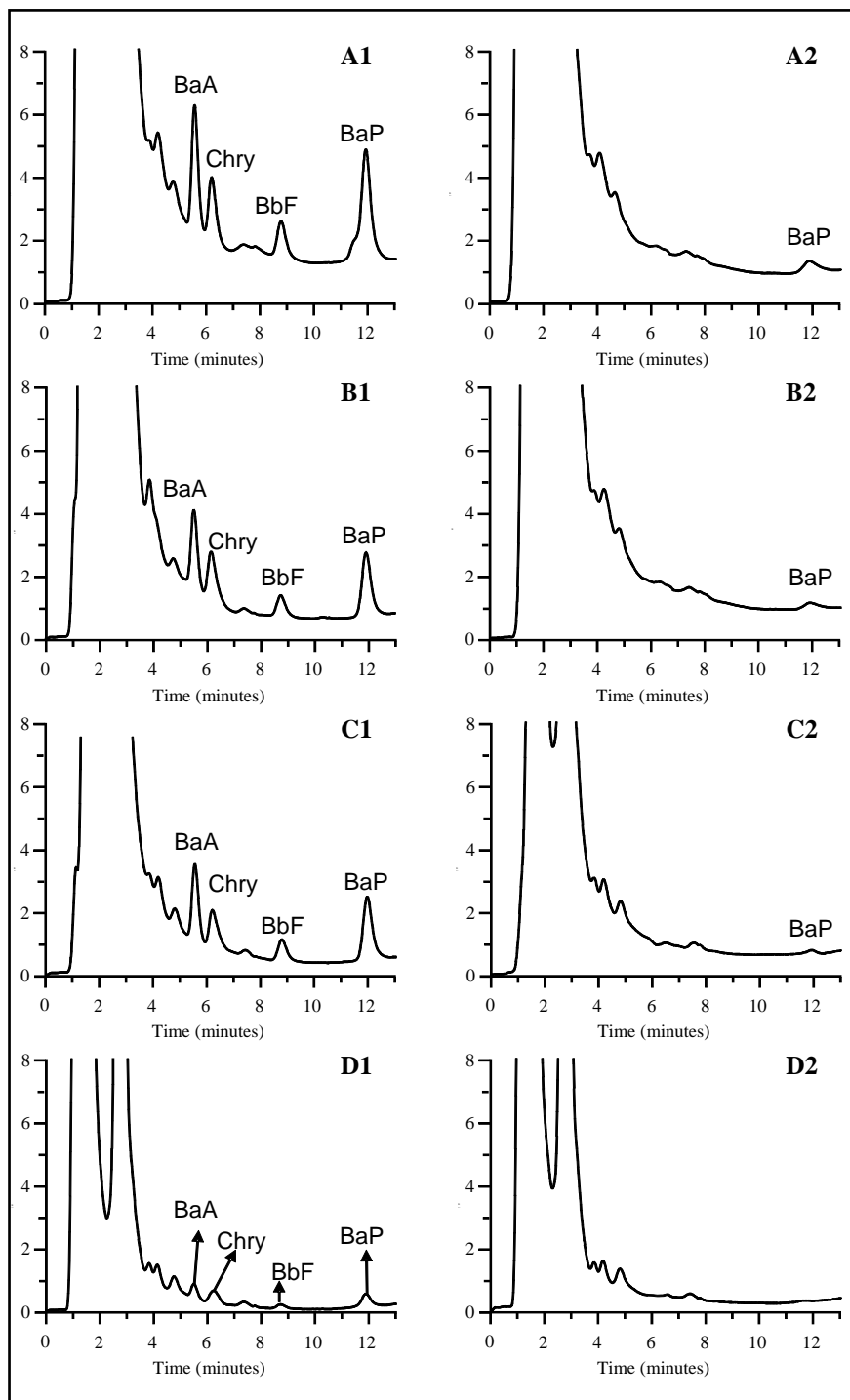


Figura 26 Cromatogramas de muestras 1) fortificadas y 2) no fortificadas de A) mejillón, B) pavo, C) bacalao y D) papilla:

3.4. Microextracción de clorofenoles en una gota de disolvente supramolecular

Los disolventes supramoleculares son potencialmente idóneos para su uso en el formato de microextracción en una gota (SDME) dada su versatilidad, capacidad de extracción y compatibilidad con cromatografía de líquidos. En las investigaciones presentadas en esta Memoria demostramos por vez primera la viabilidad de esta aplicación, los requisitos que deben cumplir los disolventes supramoleculares para poder ser utilizados en este formato, y las características cinéticas y termodinámicas que definen la extracción.

En la Figura 27 se esquematiza el montaje experimental propuesto para la microextracción en una gota de disolvente supramolecular. El elemento esencial es una microjeringa en cuyo extremo se introduce un tubo de teflón deflagrado que aumenta la superficie de adhesión de la gota. De esta forma pueden suspenderse gotas con volúmenes de hasta 50 μL que posteriormente se analizan mediante inyección directa de las mismas en el cromatógrafo de líquidos.

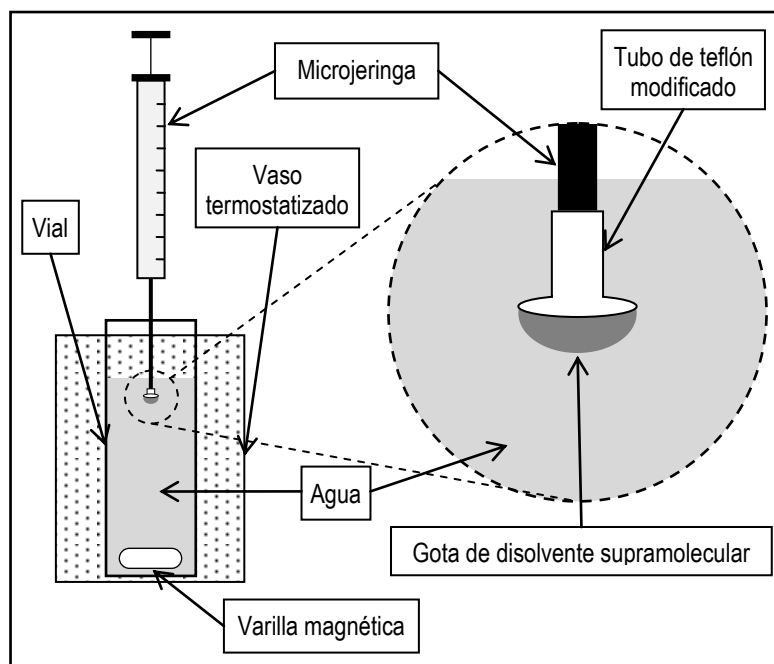


Figura 27 Esquema del montaje propuesto para la microextracción en una gota de disolvente supramolecular

3.4.1. *Formación de gotas de disolvente supramolecular*

Aspectos teóricos

Para que una gota de disolvente supramolecular permanezca estable en la punta de una microjeringa debe producirse un equilibrio entre tres fuerzas de acuerdo con la estática de fluidos. La fuerza ascendente de flotación de la gota; la fuerza gravitatoria que actúa sobre la gota y que depende de su masa; y la fuerza de adhesión entre la gota y la superficie con la que está en contacto. Esta última es de carácter intermolecular y se mantiene constante mientras lo hagan las condiciones experimentales. La tensión superficial mantendrá la gota adherida hasta que se alcance un volumen crítico en el que la gota se liberará y flotará o se hundirá dependiendo de la diferencia de densidades entre el agua y el disolvente supramolecular.

Otro aspecto a tener en cuenta es que el fenómeno de coacervación es reversible, por lo que es lógico pensar que sería necesario mantener las condiciones coacervantes en la disolución acuosa en la que se sumerge la gota de disolvente supramolecular.

En este sentido se llevaron a cabo pruebas preliminares con coacervados producidos a partir de diversos tensioactivos: micelas no iónicas (Tritón X-114, Tritón X-100, Brij 30 y Brij-52), micelas aniónicas de dodecilsulfato, micelas inversas de ácido octanoico y vesículas de ácido decanoico. Tan sólo en el caso de las vesículas no fue necesario mantener las condiciones de coacervación para evitar la solubilización de las gotas, lo que se explica por la mayor rigidez de la estructura de las mismas.

Los coacervados de micelas no-iónicas y aniónicas no formaron gotas en la punta de la microjeringa ya que la fuerza de cohesión interna no fue suficiente y el disolvente se dispersó en la disolución acuosa. Los coacervados de micelas inversas y vesículas formaron gotas esféricas en la punta de microjeringa gracias a la fuerza de cohesión que proporcionan los numerosos enlaces de hidrógeno entre las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos carboxílicos. Estas gotas se desprenden al alcanzar un volumen de 1 μL adhiriéndose a la pared externa de la aguja de la jeringa.

Aspectos prácticos

Para aumentar la estabilidad y el volumen de las gotas formadas, se introdujo la punta de la aguja de la microjeringa en un tubo de teflón deflagrado. De esta forma se produjo un aumento en la fuerza de adhesión, que permite mayores volúmenes de gota (hasta 50 μL) ofreciendo una mayor versatilidad de la técnica propuesta.

La selección del disolvente supramolecular de vesículas de ácido decanoico se hizo en base a que no es necesario que la disolución acuosa que se va a analizar mantenga las condiciones de coacervación, y a la variedad de interacciones que las vesículas pueden establecer con analitos de diferente naturaleza. La síntesis del disolvente supramolecular se lleva a cabo con anterioridad a su uso. Para ello se mezclan en una disolución acuosa, ácido decanoico e hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) en una proporción molar 2:1.

Se estudió la estabilidad de estas gotas de disolvente supramolecular bajo condiciones de agitación y se comprobó que la velocidad de agitación a la que la gota se mantenía en su posición era inversamente proporcional a su volumen y directamente proporcional a la altura sobre el fondo a la que se situaba (Figura 28)

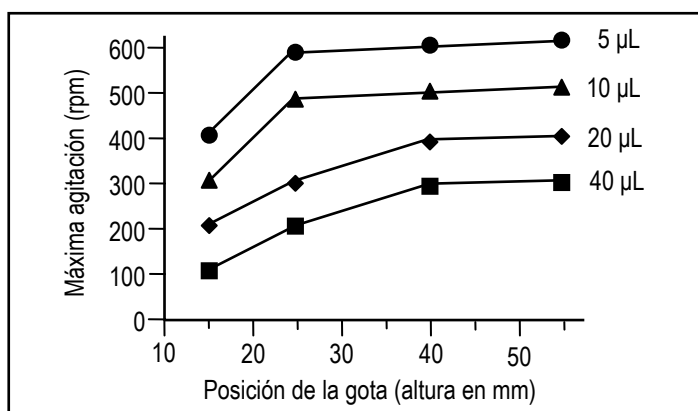


Figura 28: Máxima agitación soportada por una gota de disolvente supramolecular suspendida en la punta de una microjeringa en función de su volumen y de su altura sobre el agitador magnético

Otro aspecto importante a ser considerado es la solubilización del disolvente supramolecular que forma la gota, debido al equilibrio de los agregados con monómeros en fase acuosa. Para estudiar este parámetro se sumergieron gotas de 20 μL en agua destilada durante 13 horas. La pérdida de volumen con respecto al tiempo se muestra en la Figura 29.

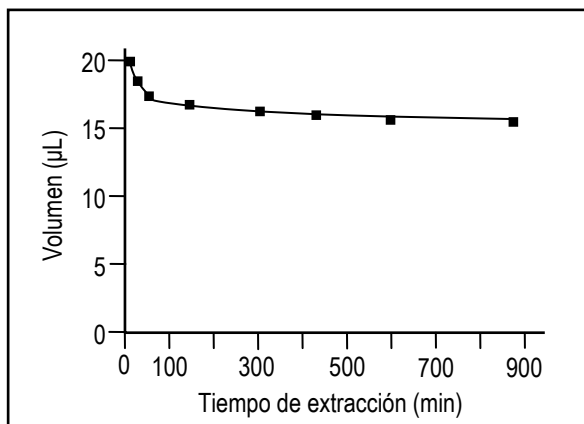


Figura 29: Evolución del volumen de la gota de disolvente supramolecular en función del tiempo de extracción a causa de la solubilización

Como puede observarse, tan solo se solubilizan entre 2 y 4 μL de disolvente supramolecular, la mayor parte de los cuales (entre 2 y 3 μL) se solubilizan en la primera hora de exposición de la gota a los 10 mL de agua agitada. Este aspecto debe ser tenido en cuenta para el cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos de la extracción.

Aspectos cinéticos

Desde un punto de vista cinético, la microextracción en una gota puede predecirse a partir de la siguiente ecuación

$$C_S = C_{S,eq}(1 - e^{-kt}) \quad [1]$$

donde $C_{S,eq}$ es la concentración de equilibrio del analito en el disolvente supramolecular y k la constante de reparto aparente, dada por la Ecuación 2

$$k = A_i \beta_0 \left(\frac{K_D}{V_{aq}} + \frac{1}{V_S} \right) \quad [2]$$

donde A_i es el área interfacial entre la gota de disolvente supramolecular y el agua, β_0 es el coeficiente de transferencia de masa con respecto al disolvente supramolecular, K_D es el coeficiente de distribución y V_{aq} y V_S son los volúmenes de las fases acuosa y supramolecular respectivamente. Tal como muestra la Figura 30, más del 98% del analito es extraído en la fase supramolecular en condiciones de equilibrio. Los puntos obtenidos en dicho estudio se ajustan perfectamente ($r^2=0,993$) a la Ecuación 1, obteniéndose un valor para k de $(4,1\pm 0,2)\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Una característica fundamental de la microextracción en una gota es que no se trata de una técnica exhaustiva, es decir, no se persigue la extracción cuantitativa de los analitos de interés, sino más bien se busca un nivel de preconcentración que disminuya el límite de detección del método. Para poder usar este modo de operación de manera óptima es imprescindible conocer el modo en que las diferentes variables operacionales van a influir en el proceso de extracción.

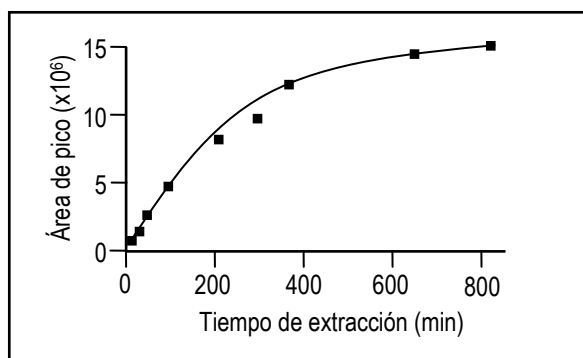


Figura 30: Extracción de PCP en una gota de disolvente supramolecular en función del tiempo

3.4.2. Extracción

Se estudiaron los parámetros que afectan a la eficacia de la microextracción en una gota de disolvente supramolecular de los cuatro clorofenoles de interés (CF, DCF, TCF y PCP). El tiempo necesario para llevar a cabo la extracción se estudió en el intervalo comprendido entre 15 y 60 minutos, usando gotas de disolvente supramolecular de $30 \mu\text{L}$ en 20 mL de agua fortificada con $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada clorofenol. Como es habitual, al aumentar el tiempo de contacto entre la gota aceptora y la disolución donadora, aumenta la cantidad de analito extraído (Figura 31), siendo visible un aumento muy significativo a partir de 30 minutos de

extracción. Teniendo en cuenta que es conveniente ajustar el tiempo de extracción al tiempo necesario para completar un cromatograma, se seleccionó un tiempo de 60 minutos como el más adecuado para llevar a cabo la extracción. Es importante señalar que en técnicas como la microextracción en una gota en que las condiciones de trabajo se encuentran alejadas del estado de equilibrio, el control del tiempo de extracción es fundamental para asegurar la reproducibilidad de las extracciones.

El volumen de la gota de disolvente supramolecular también es determinante en la eficacia de la extracción ya que al aumentar el volumen aumenta significativamente el área interfacial A_i . En la Figura 32 se representan los resultados obtenidos en este estudio. Volúmenes mayores de 30 μL producen gotas muy inestables que se desprenden con facilidad de la punta de la microjeringa y no se consideraron en este estudio.

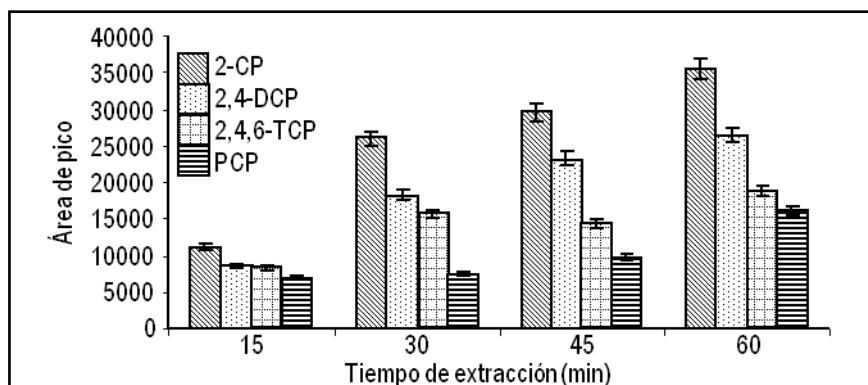


Figura 31 Efecto del tiempo en la microextracción en una gota de disolvente supramolecular de los clorofenoles estudiados

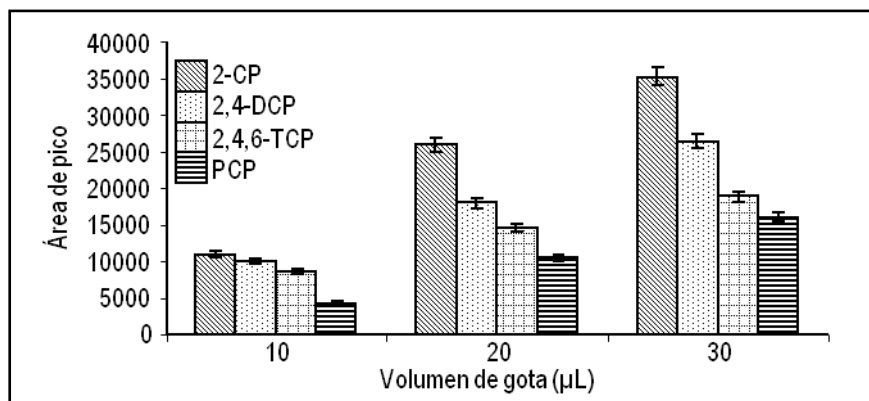


Figura 32: Efecto del volumen de gota en la microextracción en una gota de disolvente supramolecular de los clorofenoles estudiados

Otros parámetros que se estudiaron relacionados con la cinética de la extracción fueron la velocidad de la agitación, la temperatura a la cual se lleva a cabo la extracción y la adición de sales. En el caso de la velocidad de agitación y la temperatura, el comportamiento observado fue similar al descrito para otras aplicaciones de microextracción en una gota: la eficacia de extracción aumentó al incrementarse ambos parámetros. El comportamiento de la gota de disolvente supramolecular al aumentar la velocidad de agitación es de desestabilización, por lo que para los 30 μL seleccionados la máxima velocidad de agitación permitida es de 300 rpm. En relación a la temperatura, a partir de los 40°C se produjeron burbujas alrededor de la gota que provocaron su desestabilización. Es por ello que se seleccionó una temperatura de 40°C para realizar la extracción. El control de temperatura se llevó a cabo mediante un vaso con camisa conectado a un baño termostato de flujo. La adición de sales a la disolución causó un efecto diferente al habitual, ya que generalmente el efecto de “salting-out” aumenta la eficacia de la extracción. Sin embargo, concentraciones de sal superiores a 0,1M causaron la pérdida de cohesión en la gota.

El pH tiene una influencia determinante en la extracción, de la misma forma en que lo tiene para la síntesis y estabilidad del disolvente supramolecular. Para comprobar su efecto, se cambió el pH del agua entre 3 y 9, intervalo en el cual el disolvente supramolecular es estable. Teniendo en cuenta que los pK_a de los analitos son 8,5 para CF, 8,05 para DCF, 6,59 para TCF y 4,68 para PCP, estos pueden encontrarse en forma iónica o neutra en el intervalo considerado. La máxima extracción se produjo a pH 5, lo que demuestra que la forma neutra es extraída preferentemente, aunque para el compuesto más apolar (PCP), la forma iónica presenta también un rendimiento de extracción elevado. A valores de pH inferiores a los estudiados, la gota se vuelve inestable del mismo modo que ocurría con la concentración de sal.

3.4.3. *Cuantificación*

Los analitos extraídos en la gota de disolvente supramolecular sintetizado a partir de vesículas de ácido decanoico/decanoato se inyectan en un sistema cromatográfico acoplado a un detector de diodos en fila. En la Figura 33 se muestran algunos cromatogramas obtenidos con el método propuesto. Las características analíticas del método se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Características analíticas del método de SDME de clorofenoles con disolvente supramolecular

Analitos	Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
CP	2-500	0.997	0.1	5.6
DCP	2-500	0.994	0.1	4.3
TCP	2-500	0.990	0.1	4.4
PCP	4-500	0.998	0.3	4.8

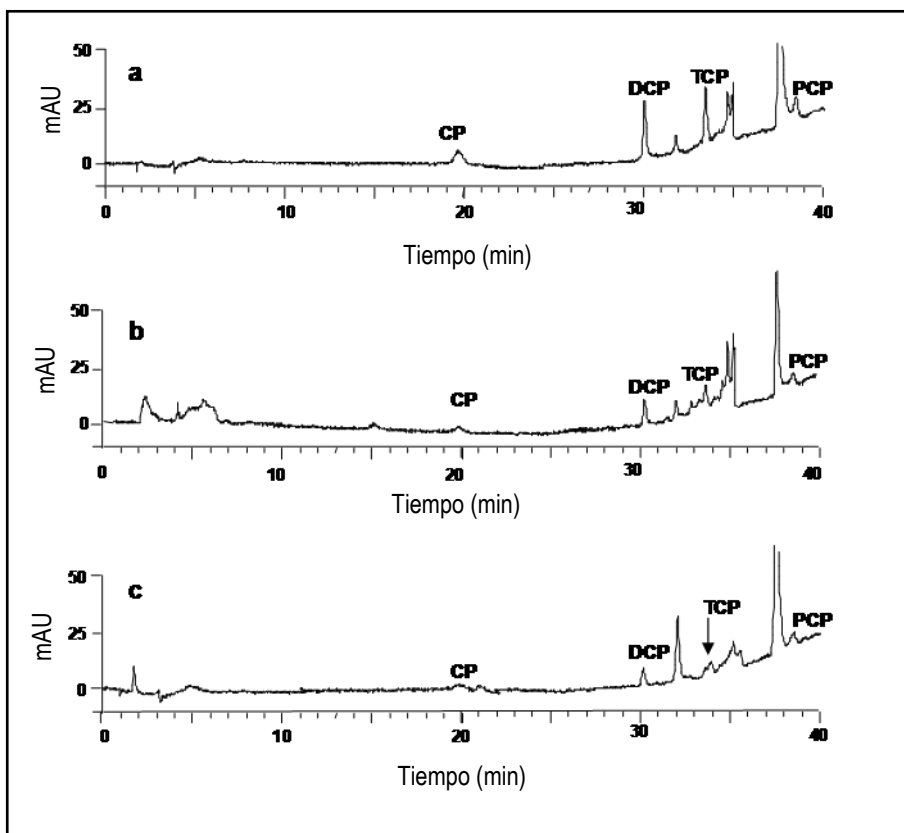


Figura 33: Cromatogramas obtenidas mediante microextracción con una gota ($30 \mu\text{L}$) de disolvente supramolecular de (a) una disolución estándar ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), (b) agua residual y (c) agua de pozo ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)

La linealidad del método se calculó mediante extracciones de disoluciones acuosas con concentraciones crecientes de los diferentes clorofenoles analizados, ya que la microextracción en una gota no es un método exhaustivo. Los coeficientes de correlación obtenidos muestran una buena linealidad. Los límites de detección se calcularon a partir de la extracción de cinco extracciones de agua sin clorofenoles usando un criterio de relación señal:ruido de 3, y la precisión se calculó mediante extracción de 5 muestras de agua fortificada con $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada clorofenol.

Finalmente se analizaron diversas muestras de agua de interés ambiental, en las que no se encontró ninguno de los clorofenoles estudiados. Sin embargo, mediante fortificación se estudió la recuperación aparente en cada matriz. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 17.

Tabla 17: Recuperaciones aparentes \pm desviación estándar (n=3) de clorofenoles en muestras de agua fortificada

Tipo de muestra	Nivel de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CP	DCP	TCP	PCP
Agua residual	5	79 \pm 5	86 \pm 7	98 \pm 5	104 \pm 6
	10	97 \pm 4	99 \pm 5	85 \pm 6	94 \pm 4
	20	91 \pm 8	91 \pm 8	89 \pm 5	94 \pm 6
Agua de embalse	5	100 \pm 4	106 \pm 3	92 \pm 7	105 \pm 3
Agua subterránea	5	84 \pm 6	96 \pm 7	102 \pm 4	92 \pm 6

CONCLUSIONES

A continuación se exponen las principales conclusiones que pueden extraerse de las investigaciones realizadas, comenzando por aquellas de carácter general para continuar con las conclusiones específicas de acuerdo a la naturaleza del extractante y de la técnica de extracción empleada y, en su caso, del agregado supramolecular utilizado.

1. Conclusiones generales

- Se han desarrollado seis metodologías en las que agregados supramoleculares de tensioactivo constituyen una fase líquida o sólida que se usa como extractante, o bien, actúan como plantillas en la síntesis de materiales adsorbentes con características especiales para extracción.
- En todos los casos, la técnica de extracción/preconcentración empleada fue directamente compatible con la cromatografía de líquidos, una técnica de separación ampliamente extendida en análisis ambiental y agroalimentario, pudiendo inyectarse los extractos sin que tuviera que mediar un cambio de disolvente o etapa de *clean-up*. En las seis metodologías propuestas se elimina o reduce de forma considerable la cantidad de disolventes orgánicos típicamente necesarios en el análisis de los compuestos de interés.
- Gracias a la elevada capacidad de extracción de los disolventes supramoleculares, la cantidad de muestra necesaria para obtener límites de detección adecuados es muy pequeña, lo que facilita la implementación de técnicas de microextracción, aumentando así la operatividad y reduciendo costes.

2. Conclusiones específicas

a. Extracción de ftalatos con hemimicelas

- Se ha demostrado que las hemimicelas de dodecilsulfato adsorbidas sobre alúmina extraen cuantitativamente los ésteres de ftalato disueltos en aguas residuales y el extracto resultante es compatible con cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas con trampa iónica.
- Las fuertes interacciones que se establecen entre las hemimicelas y los ftalatos son las responsables de la elevada eficacia de extracción alcanzada y del elevado volumen de ruptura obtenido (hasta 1 L). De esta forma se puede obtener un factor de preconcentración de 5000, después de la evaporación y reconstitución del extracto en 200 μL de disolvente.
- Los límites de detección del método para los ésteres de ftalato analizados están comprendidos entre 0.07 y 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

b. Evaluación de MSU-1 como adsorbente en SPE

- Se ha evaluado por vez primera el material silíceo mesoporoso MSU-1 para la extracción de sustancias neutras en un amplio intervalo de polaridad, compuestos iónicos y tensioactivos.
- Comparado con los materiales silíceos convencionales, MSU-1 presenta mayor eficacia de extracción y volúmenes de ruptura para compuestos neutros e iónicos, debido a la mayor área superficial del material mesoporoso. La eficacia de extracción es excepcionalmente elevada para tensioactivos, ya que éstos se adsorben en la estructura porosa reconstituyendo los agregados que se utilizaron para la síntesis del material adsorbente.
- Se ha desarrollado una metodología para la extracción de compuestos de benzalconio (volumen de ruptura 1250 mL) utilizando cromatografía de líquidos y espectrometría de masas de trampa iónica. Los límites de cuantificación del método para los compuestos de benzalconio de 12 a 16 átomos de carbono están comprendidos entre 2.7 y 12.7 ng L^{-1} lo que permite determinar la concentración

de los mismos a los niveles que generalmente se encuentran en aguas ambientales naturales. Asimismo, el método presenta adecuada selectividad para su aplicación a muestras de aguas residuales.

c. Extracción líquido-líquido-sólido de colorantes Sudán en muestras de alimentos con disolventes supramoleculares

- El disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido decanoico en tetrahidrofurano en presencia de agua es un buen extractante de colorantes tipo Sudán en salsas precocinadas que contienen chile picante. La combinación de la microextracción con cromatografía de líquidos acoplada a un detector de diodos en fila ha permitido el desarrollo de un método simple y rápido con límites de detección comprendidos entre 2.7 y 7.4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.
- El método propuesto constituye una alternativa ventajosa a las metodologías existentes para el análisis de estos colorantes en alimentos, ya que en éstas es necesario el uso de hasta 50 mL de disolvente orgánico y posterior evaporación del mismo. El método propuesto emplea 4 mL de tetrahidrofurano, sin necesidad de una etapa de preconcentración adicional y sólo requiere el tratamiento de 1 g de muestra. El tiempo de extracción total se reduce a 30 minutos, con la posibilidad de tratar varias muestras al mismo tiempo, obteniendo rendimientos de extracción superiores al 85%

d. Extracción sólido-líquido de sustancias alteradoras del sistema endocrino en sedimentos con disolventes supramoleculares

- Se ha propuesto el disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de decanol para la microextracción de estrógenos naturales y sintéticos y compuestos con actividad estrogénica de amplio uso industrial, en sedimentos.
- El decanol forma estructuras hexagonales inversas en el disolvente con cavidades acuosas cuyo tamaño puede modificarse variando la composición de la disolución hidroorgánica en la que se produce el autoensamblado del anfífilo.
- El disolvente actúa como un material de acceso restringido para macromoléculas tales como ácidos húmicos y fúlvicos que no se extraen en las cavidades acuosas

del mismo. Como resultado, las etapas de extracción de los analitos y limpieza de la muestra se realizan simultáneamente, con el consiguiente ahorro de tiempo y costes.

- El análisis directo de los extractos del disolvente supramolecular mediante cromatografía de líquidos y espectrometría de masas de triple cuadrupolo, permite la determinación de los alteradores endocrinos analizados en sedimentos con límites de detección en el intervalo entre 0,03 y 0,4 ng g⁻¹.

e. Extracción líquido-sólido de PAHs en alimentos con disolventes supramoleculares

- Se ha desarrollado un método para determinar 4 PAHs considerados por la Unión Europea como un buen indicador de la contaminación por este tipo de hidrocarburos en alimentos. Para ello, se ha empleado un disolvente supramolecular sintetizado a partir de un coacervado de vesículas de ácido octanoico y octanoato con tetrabutilamonio, añadido directamente sobre 200 mg de diversas muestras de alimentos (pescados y carnes ahumados, mejillón y comida para bebés). La extracción directa en dos etapas (extracción y centrifugación) fue acoplada a cromatografía de líquidos con detección fluorescente. Los límites de detección del método estuvieron comprendidos entre 0.1 y 0.2 µg Kg⁻¹ lo que permite la determinación de estos contaminantes por debajo de los niveles máximos permitidos por la legislación europea.
- La extracción de PAHs fue cuantitativa y el procedimiento global de tratamiento de muestras requirió 30 minutos pudiéndose procesar varias muestras simultáneamente y eliminando completamente el uso de disolventes orgánicos volátiles.

f. Microextracción de clorofenoles en agua con una gota de disolvente supramolecular

- Se ha propuesto por vez primera una metodología que emplea la configuración de microextracción en una gota con un disolvente supramolecular sintetizado a partir de vesículas de ácido decanoico y decanoato con tetrabutilamonio. Esta gota de disolvente supramolecular de 30 µL se inyectó directamente en un

cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de diodos en fila, para la cuantificación de clorofenoles en muestras de 20 mL de aguas residuales y naturales embalsadas.

- Se han discutido los aspectos teóricos y prácticos que gobiernan la formación, estabilidad y comportamiento de la gota de coacervado en la punta de la jeringa. Sólo aquellos disolventes supramoleculares cuyo intercambio de monómeros con la disolución es muy lento (ej. agregados vesiculares) pueden utilizarse en este formato de microextracción.
- Se ha demostrado que la cinética de extracción en la gota de coacervado se ajusta a la ecuación utilizada para explicar el comportamiento de la cinética de extracción en gotas de disolventes orgánicos.
- Los límites de detección del método desarrollado para la determinación de clorofenoles varían entre 0,1 y 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- La mayor ventaja del uso de gotas de coacervado en relación con gotas de disolvente orgánico para microextracción, es la capacidad de los primeros para proporcionar diferentes microambientes y distintos mecanismos de solubilización para los analitos y su compatibilidad con las fases móviles en cromatografía de líquidos.

APÉNDICE 1

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS
DERIVADAS DE LA
TESIS DOCTORAL**

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Analytica Chimica Acta 551 (2005) 142–149

ANALYTICA
CHIMICA
ACTAwww.elsevier.com/locate/aca

Determination of phthalate esters in sewage by hemimicelles-based solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito*

Department of Analytical Chemistry, Edificio Marie Curie (Anexo), Campus Universitario de Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain

Received 3 June 2005; received in revised form 15 July 2005; accepted 19 July 2005

Available online 16 September 2005

Abstract

Hemimicelles-based solid-phase extraction was proposed for the concentration of high volume commodity phthalates from wastewater samples prior to their separation and quantitation by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization in positive mode, ion trap mass spectrometry. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), butyl benzyl phthalate (BBP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) were concentrated on hemimicelles of sodium dodecyl sulphate (SDS) produced on alumina on the basis of hydrophobic interactions. The recovery of the target compounds was found quantitative under a wide range of experimental conditions (15–255 mg SDS g⁻¹ alumina, pH 2–6 and sample loading volume up to 1 L). Concentration factors of 2500 were achieved by SPE of 0.5 L of sewage samples. The method detection limits found for BBP, DBP and DEHP were 7, 15 and 16 pg, respectively. The relative standard deviation ranged from 2 to 5%, which indicated good method precision. The approach developed was applied to the determination of phthalates in raw and treated sewage samples.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phthalate esters; Sewage; Hemimicelles; Solid-phase extraction; Liquid chromatography; Mass spectrometry

1. Introduction

Phthalic acid esters (named PAEs or simply phthalates) are used in the industry as plastic additives due to their excellent properties and compatibility with vinyls and other polymers. They represent more than 90% of the Western European plasticisers market. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) accounts for about 50% of the total production of PAEs. Other high volume commodity phthalates are butyl benzyl phthalate (BBP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) [1]. We can find PAEs in the composition of soft PVC, carpet backings, coatings, paints, glues, cosmetics, plastic medical devices and other quotidian elements.

The presence of phthalates in many daily-used objects, their reported estrogenic character [2] and their high environmental diffusion have been the reasons why regulations on

water and air concentrations, disposal and worker exposure criteria have been formulated for the most heavily used phthalates. Thus, the US Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum admissible concentration (MAC) in water of 6 µg L⁻¹ for DEHP. The levels reported for DBP, BBP and DEHP are in the range 0.02–0.6 µg L⁻¹ for drinking water [3], 0.1–100 µg L⁻¹ for surface water, 0.2–110 µg L⁻¹ for treated wastewater [4] and 0.1–12 µg L⁻¹ for treated industrial wastewater [5].

The most common technique for PAEs determination in environmental samples has been gas chromatography with detection through electron capture [6,7] or mass spectrometry [3,5,8,9]. As a rule, extensive sample treatment, involving repetitive liquid–liquid extractions and cleanup steps with large amounts of reagents and solvents, is required, which introduces considerable levels of PAEs into the sample matrix [10,11]. In recent years, solid-phase microextraction (SPME) has been extensively investigated to simplify sample treatment prior to GC analysis of PAES [3,5,7,9,12–14]. The use

* Corresponding author. Fax: +34 957 218644.

E-mail address: qa1pebem@uco.es (D. Pérez-Bendito).



Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography

Theoretical and practical considerations

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito*

Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba, Edificio Marie Curie (Anexo), Campus Universitario de Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2007

Received in revised form 19 March 2008

Accepted 7 May 2008

Available online 10 May 2008

Keywords:

Single-drop microextraction

Coacervate

Vesicles

Liquid chromatography

Organic compounds extraction

ABSTRACT

Coacervates made of surfactant aggregates, namely aqueous and reverse micelles and vesicles, were firstly used as solvents in single-drop microextraction (SDME) and proposed for the extraction and concentration of chlorophenols prior to liquid chromatography. The formation of coacervate drops in the needle tip of conventional microsyringes depended on the type of intermolecular forces established between the surfactant headgroups making up the supramolecular aggregates; hydrogen bond interactions were strong enough to permit the formation of spherical drops. Stability of 1–50 μL coacervate drops was achieved by introducing the microsyringe needle tip in a PTFE rod, the end of which had been machined out with a heated flanging-tool to get circular flanges (diameters in the range 3.5–6 mm). The parameters affecting the efficiency of single-drop coacervative microextraction (SDCME) were investigated using vesicular coacervates as a solvent and 2-chlorophenol (CP), 2,4-dichlorophenol (DCP), 2,4,6-trichlorophenol (TCP) and pentachlorophenol (PCP) as model analytes. Coacervative microextraction dynamics fit to the general rate equation of liquid–liquid extraction. The effect of variables such as extraction time, drop volume, stirring rate, pH and temperature, on the extraction of chlorophenols was similar to that described for organic solvent drops. Electrolyte concentrations above 0.1 M caused drop instability. Under the optimum conditions, detection limits were in the range 0.1–0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$. The relative standard deviation was between 4.3 and 5.6 at 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ spiked level. The method was applied to the determination of the four chlorophenols in wastewater, superficial water from a reservoir and groundwater and the recoveries were in the range 79 and 106% at 5–20 $\mu\text{g L}^{-1}$ spiked level.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The world of analytical chemistry increasingly involves smaller scales and miniature devices. In this context, microextraction techniques are the result of looking for the miniaturization of classical extraction techniques in order to expend minimum analysis time and chemicals [1]. In recent years, efforts have been made towards the miniaturization of the traditional liquid–liquid extraction. These “micro-techniques”, based on the contact between two immiscible liquids, fall into two categories [2], namely microextractions using immiscible liquid films [3–5] and single-drop microextraction (SDME) [4,6–9].

The most extended drop-based configuration in SDME consists of an organic solvent drop hanging from the tip of a GC syringe needle, immersed in an aqueous sample or exposed to headspace

[4,9]. SDME is a simple, inexpensive, fast, effective and virtually solvent-free sample pre-treatment technique [1]. In combination with GC, it has successfully been used to extract and concentrate a variety of organic compounds from environmental [10–17], food [10,18] and biological [16,19] samples. However, the applicability of SDME to LC has been restricted because the solvents commonly used in SDME, e.g. toluene, hexane, isooctane, carbon tetrachloride, etc., are not compatible with the reversed phase mode and, besides, the low drop volume used (typically 1 μL) causes low sensitivity in LC analysis.

Different strategies have been developed to surpass the above drawbacks. The compatibility of SDME with LC can be achieved using single-drop liquid–liquid–liquid microextraction (SD-LLLME) [20], which involves the use of three phases, namely the donor (sample), organic and aqueous acceptor phases. Another alternative is to use ionic liquids as solvents [21–23]; they are LC-compatible, water immiscible and non-volatile, thus allowing the application of longer sampling times in headspace SDME. In order to increase the drop volume permitted for extraction, different modifications of

* Corresponding author. Tel.: +34 957 218644; fax: +34 957 218644.
E-mail address: qa1pebem@uco.es (D. Pérez-Bendito).



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Supramolecular solvent-based microextraction of Sudan dyes in chilli-containing foodstuffs prior to their liquid chromatography-photodiode array determination

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio*, Dolores Pérez-Bendito

Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba, Anexo Marie Curie, Campus Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2009

Received in revised form 6 October 2009

Accepted 29 December 2009

Keywords:

Supramolecular solvent

Reverse micelles

Microextraction

Sudan dyes

Chilli-containing foodstuffs

Liquid chromatography

Diode array detection

ABSTRACT

A supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid was proposed for the simple and rapid extraction of Sudan I, II, III and IV from chilli-containing foodstuffs. The procedure involved the extraction of minute quantities (0.5–1 g) of homogenised food sample with an aqueous solution containing 10% THF and 200 mg of decanoic acid, conditions under which the supramolecular solvent (around 330 μL) formed *in situ* and instantaneously. The overall sample treatment took about 30 min and several samples could be simultaneously treated using conventional lab equipment. No clean-up or solvent evaporation were required before determination of Sudan dyes by liquid chromatography and photometric detection. Extractions were independent of salt addition (up to 1 M), the temperature (up to 60 °C) and the pH (below 4) rendering the method robust. The detection limits of the method were 4.2, 2.7, 6.5 and 7.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for Sudan I, II, III and IV, respectively. Recoveries obtained by applying this approach to the analysis of six chilli-containing sauces fortified with Sudan dyes at the $\mu\text{g kg}^{-1}$ level were in the interval 86–108% with relative standard deviations between 2% and 7%.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sudans are a group of azo dyes widely used as additives in fuels, plastics, waxes, shoe and floor polishes, printing inks and the textile industry. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified Sudan dyes as category 3 carcinogens (International Agency for Research on Cancer, 1975), so their use as additives in food products for human consumption is banned worldwide, except in some African and Asian countries. According to the data collected through the RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed, European Regulation 2002/178/EC), there were 390 notifications in the period 2003–2004 about the fraudulent use of dyes in food, mainly involving chilli or curry powder contaminated with either Sudan I or IV or a combination of both (RASFF Annual Report, 2006). Most cases identified India as the country of origin of the adulterated products, followed by Turkey. To solve this problem, the European Commission adopted emergency measures regarding the chilli and chilli products (European Commission Decision 2005/402/EC). This regulation prohibits the import of this type of foods unless an original analytical report accompanying the consignment demonstrates that they do not contain Sudan I–IV. Likewise, Member States should take appropriate measurements in order to verify the absence of Sudan dyes. The consequence of this control has been a sharp decrease in the number of notifica-

tions about the fraudulent use of dyes in food (213 notifications in 2005, 60 in 2006 and 47 in 2007, RASFF Annual Reports (2006, 2007). In order to keep this pressure on the market, a number of analyses have to be made and, therefore, the development of rapid, simple, low cost and reliable analytical methods is highly valuable.

Several methods have been reported in the literature to quantify Sudan dyes in foods. Liquid chromatography combined with photometry (Cornet, Govaert, Moens, Van Loco, & Degroot, 2006; Ertaş, Özer, & Alasalvar, 2007; Mazzetti et al., 2004; Puoci et al., 2005) and mass spectrometry (Calbani et al., 2004a; Calbani, Careri, Elviri, Mangia, & Zagnoni, 2004b; Ferrer, Fernández-Alba, & Ferrer, 2007; He et al., 2007; Ma, Luo, Chen, Su, & Yao, 2006) are by far the preferred techniques, although others such as liquid chromatography–chemiluminescence (Zhang, Zhang, & Sun, 2006) or micellar electrokinetic capillary chromatography (Mejía, Ding, Mora, & García, 2007) have also been proposed. As a rule, different steps (i.e. extraction, clean-up and/or solvent evaporation) are required to reach adequate sensitivity and selectivity.

A variety of solvents has been used for the extraction of Sudans including dimethylsulphoxide (Ma et al., 2006), acetone (Calbani et al., 2004a, 2004b), acetonitrile (Cornet et al., 2006; Ferrer et al., 2007), ethanol (Zhang et al., 2006) and chloroform (Puoci et al., 2005). The use of solvent mixtures is also frequent (Ertaş et al., 2007; He et al., 2007). The volume of organic solvent consumed per sample extraction is relatively high (~50 mL) and, frequently, further clean-up is carried out. Solid-phase extraction (SPE) with sorbents such as alumina (He et al., 2007), molecularly imprinted

* Corresponding author. Tel./fax: +34 957 218644.
E-mail address: qa1rubrs@uco.es (S. Rubio).

Enviados a publicación:

ANALYTICA CHIMICA ACTA

Potential of non-ionic surfactant-templated mesoporous silica for the solid phase extraction of organic compounds

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

Restricted access property supramolecular solvents for combined microextraction of endocrine disruptors in sediment and sample cleanup prior to their quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry

FOOD CHEMISTRY:

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in food by vesicular supramolecular solvent-based microextraction and LC-fluorescence detection

:

APÉNDICE 2

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

ORAL INTERNACIONAL

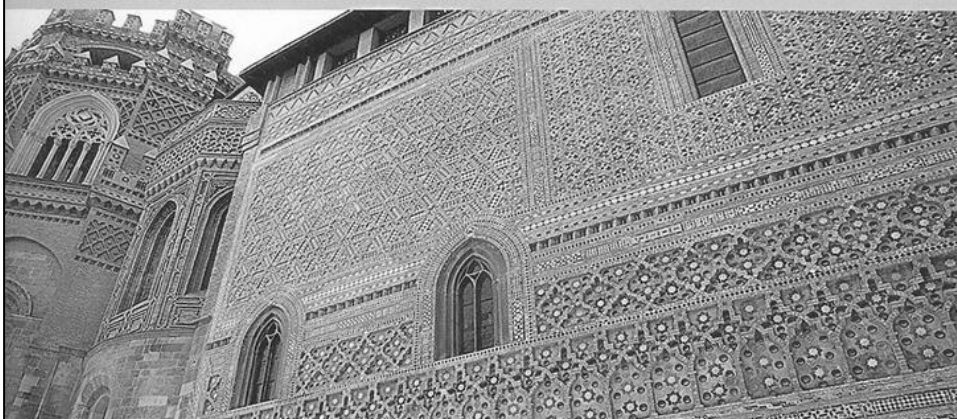
Single-Drop coacervative microextraction

Congreso: 12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological
Analysis

Zaragoza, del 17 al 20 de octubre de 2006

12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis

October 17 – 20, 2006
Zaragoza - Spain



instituto de investigación
en ingeniería de Aragón
Universidad de Zaragoza



Single-drop coacervative microextraction

F.J. López-Jiménez, S. Rubio and D. Pérez-Bendito

*Department of Analytical Chemistry. University of Córdoba.
Edificio Marie Curie (anexo). Campus Universitario de Rabanales.
E-14071, Córdoba (SPAIN).
e-mail: qa1pebem@uco.es*

Abstract

Single-drop microextraction (SDME) is a simple, inexpensive and virtually solvent free sample pretreatment technique where the extractant phase is a drop of a water-immiscible solvent suspended in the aqueous phase. The more used solvents for this purpose have been diethyl ether, n-hexane, dichloromethane, toluene and cyclohexane. The extracted analytes have been directly analysed by gas chromatography. Combination of SDME with liquid chromatography has also been described although it requires the dispersion of the water-immiscible solvent drop (1 μL) in about 30 μL of methanol.

This presentation describes for the first time the single drop coacervative microextraction. It is based on the use of coacervates as the extractant phase of SDME. Coacervates are water-immiscible liquid phases produced in colloidal solutions by the action of a dehydrating agent (e.g. changes in the temperature of pH of the solution, addition of an electrolyte, etc). Application of the coacervation phenomenon to conventional liquid-liquid extractions has mainly involved the use of aqueous micelle-based coacervates, although recently coacervates made of vesicles and reverse micelles have also been described by our research group.

The use of coacervates in single-drop microextractions offers two important features. First, the supramolecular assemblies making up the coacervates have regions of different polarity, acidity, viscosity, etc, where solutes of very different physical chemical characteristics can be solubilized. A number of interactions can be established with analytes depending of the nature of the polar group of the coacervate (mainly hydrophobic or ionic interactions, formation of mixed aggregates, hydrogen bonds, etc). So, they are very versatile extraction systems. Secondly, the coacervate drop can be directly analysed by liquid chromatography.

In the study presented here, we discussed the different parameters affecting the single-drop coacervative microextraction. Coacervates made up of aqueous and reverse micelles and vesicles were assessed for this purpose. Analytes representing different types of interactions were extracted. Extractions were made by suspending the coacervate drop at the end tip of a microsyringe needle covered with a Teflon surface to avoid its migration of the drop by capillarity. Drop volumes between 5 and 50 μL were tested. The more critical parameters affecting the mass transfer are discussed.

CARTEL INTERNACIONAL

*Analysis of Phthalate Esters in Environmental Water Samples Based on Hemimicelle-SPE
Extraction and LC/MS*

Congreso: XIII Euroanalysis

Salamanca, del 5 al 10 de septiembre de 2004

*Vesicle Based Supramolecular Solvent for the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in
Food*

Congreso: 4thRecent Advances in Food Analysis

Praga, del 4 al 6 de noviembre de 2009

euroanalysisXIII

European Conference on Analytical Chemistry



5-10 September 2004. Salamanca, Spain

"The Role of Analytical Chemistry in the Protection of the Citizens"

Organized by:

Sociedad Española de Química Analítica (SEQA)



In cooperation with:

Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología. University of Salamanca (USAL)



Federation of European Chemical Societies

Division of Analytical Chemistry

FECS Event: 281



BOOK OF ABSTRACTS



Chairman: Dr. J. Hernández Méndez
Universidad de Salamanca. Salamanca (Spain)
Co-Chairman: Dr. J.L. Pérez Pavón
Universidad de Salamanca. Salamanca (Spain)

Programme Chairman: :Dr. J. Pingarrón Carrazón
Universidad Complutense de Madrid. Madrid (Spain)

Analysis of Phthalate Acid Esters in Environmental Water Samples Based on Hemimicelle-SPE Extraction and LC/MS

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio and Dolores Pérez-Bendito
Department of Analytical Chemistry. Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales. Córdoba University. 14071-Córdoba (Spain). Fax: 34-957-218644; e-mail: qa1pebem@uco.es

Phthalate acid esters (PAEs) are widely used as plastic additives due to their excellent properties and compatibility with vinyls and other polymers. We can find PAEs in the composition of soft PVC, carpet backings, coatings, paints, glue, cosmetics, plastic medical devices and other quotidian elements. PAEs are of environmental concern since they have been reported as xenoestrogens. Concentration of PAEs in environmental water samples is below 10 µg/L, so the use of a preconcentration step prior to chromatographic analysis is mandatory.

This study deals with the use of SPE-sorbents based on surfactant adsorbed on mineral oxides for the concentration of PAEs from environmental water samples prior to their determination by LC/MS. Ionic surfactants adsorb on metal oxides such as alumina, silica, titanium dioxide and ferric oxy-hydroxides forming aggregates termed hemimicelles (surfactant monolayer without free charged heads) and admicelles (surfactant bilayer with an ionic outer surface). Although these sorbents have been scarcely exploited in analytical applications,^{1,2} important benefits have been obtained, such as high extraction yields, easy elution of analytes, high breakthrough volumes and/or high flow rate for sample loading.

The PAEs selected for this study were benzyl butyl phthalate (BBP), di-butyl phthalate (DBP), bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-octyl phthalate (DnOP). The mineral oxide was alumina and the surfactant forming the adsorbed aggregates was sodium dodecyl sulfate (SDS).

Partition of analytes to the surfactant aggregates was governed by the hydrophobicity of PAEs, both hemimicelles and admicelles having the same capacity for solubilization. Hemimicelles were selected as sorbents on the basis of greater experimental convenience for the concentration of high water volume samples. The predominant factor influencing PAEs extraction was the total amount of hemimicelles available for adsolubilization. On the contrary, adsorption of analytes was independent on the pH and breakthrough volumes of about 1 L were found.

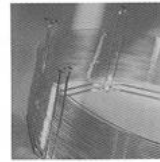
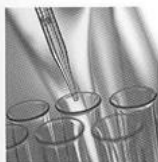
Reusability of the sorbent was investigated and determination of PAEs was carried out by LC/MS. The suitability of the developed method was assessed by its application to the analysis of PAEs in bottled, tap, river and wastewaters.

- (1) Saitoh, T.; Nakayama, Y.; Hiraide, M. J. Chromatogr. A, **2002**, 972, 205
(2) Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Anal. Chem. **2003**, 22, 470.

BOOK OF ABSTRACTS

4th International Symposium on **RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS**

November 4–6, 2009
Prague, Czech Republic



 **INSTITUTE OF
CHEMICAL TECHNOLOGY
PRAGUE**

 International Association of
Environmental Analytical Chemistry

 **RIKILT
INSTITUTE OF FOOD SAFETY
WAGENINGEN UR**

C-47

VESICLE-BASED SUPRAMOLECULAR SOLVENT FOR THE EXTRACTION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN FOOD**Soledad Rubio^{1*}, Ana Ballesteros-Gómez², Francisco José López-Jiménez³**^{1 2 3} University of Córdoba, Spain

* Corresponding author—E-mail: qa1rubrs@uco.es; Phone: 34-957-218644; Fax: 34-957-218644

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a well-known group of pollutants widely studied and internationally regulated because of their carcinogenic activity. An important way for human intake of these compounds is food. PAHs pollute food directly from air or water (vegetables, meat, fish) or during its preparation (smoked meat of fish) or cooking (roasting, charcoaling or grilling).

Recently, the European Union has published a study where sixteen PAHs are considered as carcinogenic pollutants in food and expresses the need for their regulation [1]. Up to now, European laws have only set limit levels for benz[a]pyrene (BaP) in a variety of foods including meat, fish, molluscs and infant foods. Current legislation considers BaP as an indicator of PAHs contamination, however, the study above cited considers that total occurrence of PAHs cannot be accurately predicted from BaP measurements. In this context, the development of methods that permit to obtain fast and accurate information about the presence of carcinogenic PAHs in food, at the low levels they commonly occur, is mandatory.

In this research, a new analytical method intended to meet the criteria for future regulatory decisions has been developed. It is based on the fast, low cost and efficient supramolecular solvent-based microextraction of the target carcinogenic PAHs from food and their direct quantitation in the supramolecular extract by liquid chromatography and fluorescence detection. The supramolecular solvent used for extraction was made up of vesicles of octanoic acid and tetrabutylammonium octanoate and it spontaneously formed in aqueous solutions containing octanoic acid and tetrabutylammonium hydroxide at molar ratios around 2. The procedure involved the vortex-shaking of 200 µL of supramolecular solvent and 200 mg of sample in 1.5 mL-ependorf tubes containing four glass pearls (3 mm of internal diameter) for 10 min at 2670 rpm. Then, the mixture was centrifuged at 15000 rpm for 20 minutes and an aliquot of the extract was injected in the chromatographic system. Recoveries of PAHs in samples ranged between 89 and 108 for a spiking level of 5-fold the quantitation limit of the method. Detection limits for PAHs were 0.2 µg/kg for benz[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, chrysene, dibenz[a,h]anthracene, dibenzo[a,e]pyrene, dibenzo[a,h]pyrene, dibenzo[a,i]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, 5-methylchrysene, benzo[ghi]perylene, 0.9 µg/kg for benzo[j]fluoranthene, 1 µg/kg for indeno[1,2,3-cd]pyrene and 2.5 µg/kg for benzo[c]fluorene. The method was applied to the determination of PAHs in smoked meats, fishes and molluscs proving its suitability for a wide range of foods. No interferences were detected for any of the matrices investigated.

[1] Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. European Food Safety Authority (EFSA). Parma, 2008.

Keywords: supramolecular solvents, microextraction, food, PAHs

ORAL NACIONAL

Sistemas Supramoleculares para la Extracción de Contaminantes Orgánicos

Congreso: I Congreso Científico de Investigadores en Formación

Córdoba, del 15 al 16 de noviembre de 2009

I Congreso Científico de Investigadores en Formación

M^a del Mar Delgado Serrano y José Carlos Gómez Villamandos (Coords.)



Servicio de Publicaciones
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA EXTRACCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Francisco José López Jiménez

Introducción

Los laboratorios de análisis consumen elevadas cantidades de disolventes orgánicos, fundamentalmente en las etapas asociadas al tratamiento de muestras. Con objeto de reducir su consumo, se están desarrollando estrategias encaminadas por un lado a la miniaturización de los procesos de extracción (por ejemplo, microextracción en fase sólida, microextracción líquido-líquido en una gota o en fibras huecas, etc) y, por otro lado, a la búsqueda de disolventes alternativos menos contaminantes.

Los agregados de moléculas de tensioactivo presentan un gran potencial para el desarrollo de procesos de extracción adaptados a los principios de la química verde. El uso de hemimicelas/admicelas para procesos de extracción en fase sólida, y coacervados para procesos de extracción líquido-líquido, permiten la reducción o completa eliminación de los disolventes orgánicos en la etapa de tratamiento de muestras.

Los sistemas supramoleculares presentan un conjunto de características de gran relevancia para procesos de extracción. La capacidad de extracción de los disolventes supramoleculares deriva de la especial estructura y elevada concentración de los agregados que los constituyen. Así, la estructura tridimensional de los agregados presenta regiones de diferente polaridad que muestran una excelente capacidad de solvatación para una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Por otro lado, la alta concentración de sustancias anfífilas presentes en los agregados ofrece un elevado número de centros enlazantes para los compuestos de interés, proporcionando elevados rendimientos de extracción y factores de concentración.

Desde el punto de vista operacional, las propiedades más destacadas son las siguientes: (1) los procedimientos de síntesis se basan en fenómenos de autoensamblaje y por lo tanto están al alcance de cualquier laboratorio o industria; (2) están constituidos por agua y moléculas anfífilas que son ubicuas en la naturaleza y la química sintética y además son biodegradables y económicas; (3) existe la posibilidad de modificar las propiedades de los sistemas supramoleculares variando el grupo polar o la cadena hidrocarbonada del compuesto anfílico que lo constituye y (4) son sistemas con baja volatilidad e inflamabilidad, lo que hace que los procesos de extracción sean menos contaminantes y más seguros.

Objetivos

El objetivo genérico de la tesis doctoral es el estudio y desarrollo de estrategias para la aplicación de los adsorbentes y disolventes supramoleculares en procesos de extracción y preconcentración de contaminantes de interés medioambiental y



agroalimentario.

Para ello se consideran los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de los sistemas supramoleculares para su empleo en procesos de extracción analítica, centrándonos en el uso de:
 - o Hemimicelas y admicelas de tensioactivos iónicos adsorbidos sobre superficies de óxidos metálicos
 - o Coacervados de micelas inversas y vesículas.
2. Miniaturización de los procesos de extracción para reducir el consumo de extractantes y reactivos y simplificar el tratamiento de muestras.
3. Desarrollo de la microextracción coacervativa en una gota; estudio de su comportamiento termodinámico y cinético y su aplicación a muestras reales.
4. Optimización y evaluación de los diferentes sistemas desarrollados para la extracción de diversos compuestos orgánicos en muestras medioambiental y agroalimentario.

La metodología a seguir se especifica a continuación:

1. En las investigaciones relacionadas con la aplicación a escala convencional de coacervados en procesos de extracción líquido-líquido:
 - a. Selección del sistema supramolecular más adecuado en cada problemática
 - b. Estudio/optimización de los parámetros que afecten a la extracción.
 - c. Validación del método analítico para su aplicación a muestras medioambientales.
2. En las investigaciones relacionadas con el empleo de coacervados en microextracción en una gota:
 - a. Selección del coacervado más adecuado para la extracción, considerando la formación de gotas estables y recuperables por la jeringa.
 - b. Determinación de las características físicas de la gota y su estabilidad bajo diferentes condiciones experimentales.
 - c. Estudio de los parámetros que afectan a la eficacia de la extracción.
 - d. Cálculo de los principales parámetros termodinámicos y cinéticos de la extracción.
 - e. Validación del método analítico para su aplicación a muestras



medioambientales.

3. En las investigaciones relacionadas con el empleo de los sistemas desarrollados a muestras ambientales:

- a. Selección de los contaminantes prioritarios a investigar
- b. Optimización de los parámetros que rigen la extracción/concentración y su efecto sobre cada caso particular: muestra/analito.
- c. Estudio del efecto matriz de las diversas muestras.
- d. Aplicación a la extracción de contaminantes en matrices ambientales acuosas.

Aportaciones

Con el desarrollo de las investigaciones planteadas se prevé la mejora de los procesos de separación químico-analíticos para el análisis de matrices sólidas y líquidas en medioambiente y agroalimentación sobre la base de:

- Eliminación o reducción de reactivos y disolventes orgánicos en procesos de extracción.
- Desarrollo de sistemas de micro- y nano-extracción basados en el uso de sistemas supramoleculares
- Mejora considerable de la tecnología de preparación de muestra en la determinación de contaminantes prioritarios y emergentes en medioambiente y agroalimentación al poner a disposición de los laboratorios extractantes adaptados a los principios de la química verde y procedimientos más simples y rápidos.

CARTEL NACIONAL

Alkyl Carboxylic Acid Reverse Micelles-Based Coacervates for the Extraction of Phthalates from Environmental Water Samples

Congreso: 11 Jornadas de Análisis Instrumental
Barcelona, del 15 al 17 de noviembre de 2005

Alkyl Carboxylic Acid Reverse Micelles-Based Coacervates for the Extraction of Sudan-dyes from Foodstuffs

Congreso: 21 Reunión Nacional de Espectroscopía/ 5 Congreso Ibérico de Espectroscopía
Murcia, del 9 al 11 de septiembre de 2008

Nanostructured Liquids Based on Octanoic Acid Vesicles to Extract PAHs in Food

Congreso: Nanouco II
Córdoba, 14 de enero de 2010

Extracción de compuestos de benzalconio en aguas residuales y de río con el material mesoporoso MSU-1

Congreso: XII Reunión del GRASEQA
Córdoba, del 10 al 11 de junio de 2010

El material silíceo MSU-1 como adsorbente para la extracción analítica de compuestos de benzalconio en aguas residuales urbanas

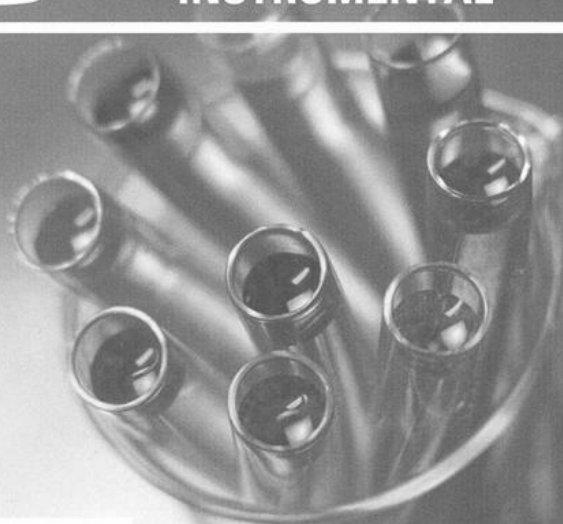
Congreso: Nanouco III
Córdoba, del 10 al 11 de febrero de 2011

 **EXPOQUIMIA**
Salón Internacional de la Química

ABSTRACTS



**11^{as} JORNADAS DE ANÁLISIS
INSTRUMENTAL**



Fira Barcelona

**Recinto Gran Vía
15-17 Noviembre 2005**



Sociedad Española de Química Analítica

11AS JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

MA - 055 PO

**ALKYL CARBOXYLIC ACID REVERSE MICELLES-BASED COACERVATES FOR
THE EXTRACTION OF PHTHALATES FROM ENVIRONMENTAL WATER
SAMPLES**

Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito
Department of Analytical Chemistry. University of Córdoba.
Edificio Marie Curie (Anexo). Campus Universitario de Rabanales. E-14071, Córdoba (Spain).
e-mail: qalpebem@uco.es; Fax: (+34) 957-21-8644; Phone: (+34) 957-21-8643

The IUPAC defines coacervation as “the separation into two liquid phases in colloidal systems.” The phase more concentrated in colloid component is the coacervate, and the other phase is the equilibrium solution. Coacervates have been used for liquid-to-liquid extraction of organic compounds providing a negligible organic solvent usage and high preconcentration factors.

The more used coacervates in analytical extraction processes have been based in non-ionic micelles (the “cloud point” technique). These coacervates have two serious drawbacks; they are commercially available as complex mixtures causing many coelution problems with analytes when coacervation is used prior to LC, and the only extraction driving-force is hydrophobicity, which seriously restricts the number of compounds that can be extracted. So, research to extend the scope of application of coacervation in analytical extraction processes is of great interest.

This study deals with the use of coacervates made of reverse micelles of octanoic acid in 2:98 (v/v) tetrahydrofuran:water mixtures for the extraction/concentration of six phthalic acid esters (PAEs) (dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), butyl benzyl phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-octyl phthalate (DnOP)) from wastewater samples prior to their LC-MS analysis. These coacervates, recently described by our research group, can extract compounds with hydrogen bond donor and acceptor atoms, in addition to apolar and amphiphilic compounds, thus greatly extending the scope of application of these extractive systems.

PAEs have been included in the pollutant priority lists of several national and international administrations. In order to determine the low levels found in the environment, a preconcentration step prior to instrumental analysis is mandatory. Organic solvent extraction (volumes over 200 ml) has been doubtless the most used technique to extract PAEs. More recently, SPE and SPME have been thoroughly investigated for this purpose. As a general rule, tedious, time-consuming steps are required to achieve selectivity.

In this research, a thorough study to determine the parameters influencing the extraction efficiency and preconcentration factors of the coacervate was carried out. The amount of octanoic acid and tetrahydrofuran were decisive for recoveries. Percentages of octanoic acid in samples, so low as 0.5% permitted quantitative extraction of DBP, BBP, DEHP and DnOP. The highly water soluble PAEs, DMP and DEP, required about 2% to achieve recoveries of ca. 75%. Percentages of tetrahydrofuran in samples of about 2% were considered optimum for recoveries. Preconcentration factors increased as the amount of octanoic acid and tetrahydrofuran decreased. Under optimal conditions, preconcentration factors of about 50 were obtained for DMP and between 135 and ca. 200 for the remaining investigated PAEs. The extraction equilibrium was rapidly achieved (about 1 minute). The pH and the ionic strength did not affect analyte recoveries.

Liquid chromatography/mass detection of PAEs was compatible with the coacervate which did not coelute with analytes. Detection limits for PAEs were between 0,1 and 1 µg/l. Validation of the method was performed by analyzing PAEs in low volume (i.e. 40 ml) wastewater and river water samples without the requirement of clean-up steps.

XXI Reunión Nacional
de Espectroscopia
V Congreso Ibérico
de Espectroscopia

Libro de resúmenes



Murcia, 9-11 de
Septiembre de 2008

Alkyl Carboxylic Acid Reverse Micelles-Based Coacervates for the Extraction of Sudan-dyes from Foodstuffs

*Francisco José López-Jiménez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito
Dept. de Química Analítica. Univ. de Córdoba. www.uco.es/grupos/FQM-186*

Sudan-dyes have been extensively used in some Asiatic countries as additives in food (i.e. chilli power, foods containing curcuma or palm-oil, paprika, steak sauces, etc.). Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV have been classified as carcinogenic (category 3) by the International Agency for Research on Cancer (IARC). As a result of different food alarms in several European countries related to the presence of these dyes in imported products, the EU has published normative to alert its members about the necessary controls to be made when chili, curcuma or palm-oil based foods arrive to the EU-borders (decision 2005/402/EC) [1]. Up to date, no maximum residue levels have been established for these compounds in food.

One of the most popular methods to determine Sudan dyes is based on liquid chromatography followed by spectrophotometric detection (LC-UV) because of the absorbance properties of azo dyes in the visible region of the spectrum. The main drawback of the developed methods arises from the complexity of the matrices involved, which forces to use laborious sample treatments with high solvent consumption.

This study deals with the use of coacervates made up of reverse micelles of decanoic acid in 2:98 (v/v) tetrahydrofuran:water mixtures for the extraction/concentration of Sudan dyes from chili-based and curcuma foodstuffs prior to their determination by LC/UV. These coacervates, recently described by our research group [2], can extract Sudan dyes based on hydrophobic and hydrogen bonds interactions using negligible amounts of organic solvent. The most influencing parameters on the extraction efficiency of coacervates such as the amount of decanoic acid, the percentage of tetrahydrofuran the extraction time and the pH, were optimized. Percentages of decanoic acid in samples, so low as 0,5% permitted the quantitative extraction of Sudan-dyes. No clean-up steps were required and the coacervate containing the target analytes were directly injected in the chromatographic system. Validation of the method was performed by analyzing several samples of unfortified and fortified foodstuffs obtained in local markets. The recoveries were quantitative and matrix-independent.

[1] Commission decision of 23 May 2005 on emergency measures regarding chilli, chilli products, curcuma and palm oil. Official Journal of the European Union No. L 135 of 28 May 2005

[2] F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *Anal. Chem.* 79, 7473-7484, 2007



Universidad de
Córdoba

IAQFN

Instituto Andaluz
de Química Fina y Nanoquímica



JUNTA DE ANDALUCÍA
Consejería de Innovación,
Ciencia y Empresa

NANO UCO

**II ENCUESTRO SOBRE
NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA
DE INVESTIGADORES Y TECNÓLOGOS
DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Córdoba, 14 de enero de 2010

Nanostructured Liquids Based on Octanoic Acid Vesicles to Extract PAHs in Food

Francisco J. López-Jiménez, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio

*Departamento de Química Analítica
Universidad de Córdoba*

*Campus Universitario de Rabanales. Ed. Marie Curie (Anexo). 14071, Córdoba
a82lojif@uco.es; <http://www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186>*

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a well-known group of pollutants widely studied and internationally regulated because of their carcinogenic activity. An important way for human intake of these compounds is food. PAHs pollute food directly from air or water (vegetables, meat, fish) or during its preparation (smoked meat of fish) or cooking (roasting, charcoaling or grilling).

Recently, the European Union has published a study where sixteen PAHs are considered as carcinogenic pollutants in food and expresses the need for their regulation³⁰. Up to now, European laws have only set limit levels for benz[a]pyrene (BaP) in a variety of foods including meat, fish, molluscs and infant foods. Current legislation considers BaP as an indicator of PAHs contamination, however, the study above cited considers that total occurrence of PAHs cannot be accurately predicted from BaP measurements. In this context, the development of methods that permit to obtain fast and accurate information about the presence of carcinogenic PAHs in food, at the low levels they commonly occur, is mandatory.

In this research, a new analytical method intended to meet the criteria for future regulatory decisions has been developed. It is based on the fast, low cost and efficient nanostructured solvent-based microextraction of the target carcinogenic PAHs from food and their direct quantitation in the extract by liquid chromatography and fluorescence detection. The nanostructured solvent used for extraction was made up of vesicles of octanoic acid and tetrabutylammonium octanoate and it spontaneously formed in aqueous solutions containing octanoic acid and tetrabutylammonium hydroxide at molar ratios around 2. The procedure involved the vortex-shaking of 200 μ L of supramolecular solvent and 200 mg of sample in 1.5 mL-ependorf tubes containing four glass pearls (3 mm of internal diameter) for 10 min at 2670 rpm. Then, the mixture was centrifuged at 15000 rpm for 20 minutes and an aliquot of the extract was injected in the chromatographic system. Recoveries of PAHs in samples ranged between 89 and 108 for a spiking level of 5-fold the quantitation limit of the method. Detection limits for PAHs were 0.2 μ g/Kg for benz[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, chrysene, dibenz[a,h]anthracene, dibenzo[a,e]pyrene, dibenzo[a,h]pyrene, dibenzo[a,i]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, 5-methylchrysene, benzo[ghi]perylene, 0.9 μ g/Kg for benzo[j]fluoranthene, 1 μ g/Kg for indeno[1,2,3-cd]pyrene and 2.5 μ g/Kg for benzo[c]fluorene. The method was applied to the determination of PAHs in smoked meats, fishes and molluscs proving its suitability for a wide range of foods. No interferences were detected for any of the matrices investigated.

³⁰ European Food Safety Authority (EFSA). Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. Parma, 2008.



REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA



Córdoba, 10 y 11 de junio



LIBRO DE RESÚMENES



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Sesión de Carteles

SC-20

Extracción de compuestos de benzalconio en aguas residuales y de río con el material mesoporoso MSU-1

Francisco José López Jiménez; Soledad Rubio

*Departamento de Química Analítica. Universidad de Córdoba
Edificio Marie Curie (Anexo) C.U. Rabanales. 14071 Córdoba
Tel: 34957218643; Fax: 34957218644; qatrubrs@uco.es; www.uco.es/sac*

Los materiales mesoporosos son fundamentalmente silicatos y aluminosilicatos que poseen un sistema poroso ordenado con una estrecha distribución de diámetros (2-10 nm) junto con elevada área superficial (~ 1000 m²/g) y volumen de poro (> 0.8 cm³/g). El agente director de la estructuras son agregados de moléculas anfífilas en torno a los cuales se produce la polimerización de los componentes inorgánicos. Los materiales mesoporosos se han utilizado en múltiples aplicaciones (catálisis, sensores ópticos, descontaminación de aguas, etc), sin embargo apenas existen aplicaciones en procesos de extracción analítica.

En este trabajo se propone la aplicación del sólido mesoporoso MSU-1 a la extracción en fase sólida de compuestos de benzalconio en aguas residuales urbanas. Los compuestos de benzalconio son homólogos de alquilbencildimetilamonio, con longitudes de cadena hidrocarbonada de entre 12 y 16 átomos de carbono, ampliamente utilizados en productos de limpieza y desinfección. Son tóxicos en ambientes acuáticos, incluso a muy baja concentración, y apenas existen datos sobre su degradación y distribución en el ambiente. Existe por tanto la necesidad de disponer de métodos simples, rápidos y económicos para la determinación de compuestos de benzalconio en ambientes acuáticos.

El sólido mesoporoso MSU-1 se sintetizó utilizando tetraetoxisilano como fuente de sílice y micelas no iónicas del tensioactivo Tergitol 15-S-12 como agente director de la estructura. Este sólido presenta estructura hexagonal, poros altamente interconectados, diámetros de poro de alrededor de 3.1nm y una superficie específica en torno a 1005 m²/g.

La extracción en fase sólida de los compuestos de benzalconio en muy diferentes tipos de agua y en las condiciones optimizadas fue siempre superior al 93%. El proceso de extracción completo implica el tratamiento de 250mL de agua residual influente, 500mL de agua residual efluente o 1250mL de agua de río con 500mg de MSU-1 y la elución con 2mL de metanol de los que se inyectaron 20µL en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica con interfase de ionización por electrospray.

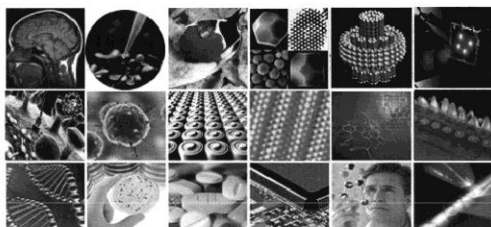
El método propuesto proporciona límites de detección comprendidos entre 2.7 y 12.7 ng/L, con una precisión, expresada como desviación estándar relativa comprendida entre 3.6 y 6.6 %. La elevada eficacia de MSU-1 para la extracción de compuestos de benzalconio deriva de las fuertes interacciones electrostáticas entre la sílice y el grupo amonio de los tensioactivos y del efecto *template* de los poros para los agentes tensioactivos.

NANO UCO

LIBRO DE RESÚMENES

NANOUCO III

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de
Investigadores y Tecnólogos Andaluces



Córdoba, 10 y 11 de febrero de 2011

P-18**EL MATERIAL SILÍCEO MSU-1 COMO ADSORBENTE PARA LA EXTRACCIÓN ANALÍTICA DE COMPUESTOS DE BENZALCONIO EN AGUAS RESIDUALES URBANAS****Francisco José López Jiménez; Soledad Rubio***Departamento de Química Analítica. Universidad de Córdoba
Edificio Marie Curie (Anexo) C.U. Rabanales. 14071 Córdoba
Tel: 34957218643; Fax: 34957218644; <http://www.uco.es/sac>
qa1rubrs@uco.es*

Los materiales mesoporosos son fundamentalmente silicatos y aluminosilicatos que poseen estructura porosa ordenada con estrecha distribución de tamaños (2-10 nm) junto con elevada área superficial (~1000 m²/g) y volumen de poro (> 0.8 cm³/g). La estructura ordenada se produce en presencia de agregados de moléculas anfífilas (que se denominan agente director) en torno a los cuales se produce la polimerización de los componentes inorgánicos. Los materiales mesoporosos se han utilizado en múltiples aplicaciones (catálisis, sensores ópticos, descontaminación de aguas, etc), sin embargo apenas existen aplicaciones descritas en procesos de extracción analítica.

En este trabajo se propone la aplicación del sólido mesoporoso MSU-1 a la extracción en fase sólida de compuestos de benzalconio en aguas residuales urbanas. Los compuestos de benzalconio son homólogos de alquilbencildimetilamonio, con longitudes de cadena hidrocarbonada de entre 12 y 16 átomos de carbono, ampliamente utilizados en productos de limpieza y desinfección. Son tóxicos en ambientes acuáticos, incluso a muy baja concentración, y apenas existen datos sobre su degradación y distribución en el ambiente. Existe por tanto la necesidad de disponer de métodos simples, rápidos y económicos para la determinación de compuestos de benzalconio en ambientes acuáticos.

El sólido mesoporoso MSU-1 se sintetizó utilizando tetraetoxisilano como fuente de sílice y micelas no iónicas del tensioactivo Tergitol 15-S-12 como agente director de la estructura. Este sólido presenta estructura hexagonal, poros altamente interconectados, diámetros de poro de alrededor de 3.1 nm y una superficie específica en torno a 1005 m²/g.

La extracción en fase sólida de los compuestos de benzalconio en muy diferentes tipos de agua y en las condiciones optimizadas fue siempre superior al 93 %. El proceso de extracción completo implica el tratamiento de 250 mL de agua residual influente, 500mL de agua residual efluente o 1250 mL de agua de río con 500mg de MSU-1 y la elución con 2 mL de metanol de los que se inyectaron 20 µL en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica con interfase de ionización por electrospray.

El método propuesto proporciona límites de detección comprendidos entre 2.7 y 12.7 ng/L, con una precisión, expresada como desviación estándar relativa comprendida entre 3.6 y 6.6 %. La elevada eficacia de MSU-1 para la extracción de compuestos de benzalconio deriva de las fuertes interacciones electrostáticas entre la sílice y el grupo amonio de los tensioactivos y del efecto *template* de los poros para los agentes tensioactivos.

Se concluyó el trabajo de composición de esta Memoria

de Tesis Doctoral en Córdoba,

a veintitrés de abril de dos mil trece

(día Internacional del Libro)

-FINIS CORONAT OPUS-