



Universidad de Córdoba

Departamento de Química Analítica

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE DISOLVENTES Y ADSORBENTES  
SUPRAMOLECULARES PARA LA EXTRACCIÓN DE  
CONTAMINANTES EN ALIMENTOS Y MUESTRAS AMBIENTALES**

***DESIGN AND APPLICATION OF SUPRAMOLECULAR SOLVENTS  
AND ADSORBENTS TO THE EXTRACTION OF CONTAMINANTS  
FROM FOOD AND ENVIRONMENTAL SAMPLES***

TESIS DOCTORAL

Ana María Ballesteros Gómez

TITULO: *Diseño y aplicación de dosolventes y adsorbentes supramoleculares para la extracción de contaminantes en alimentos y muestras ambientales*

AUTOR: *Ana María Ballesteros Gómez*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

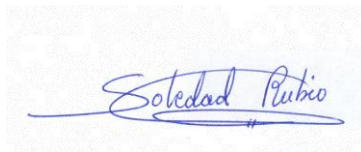
---

ISBN-13: 978-84-695-1671-3



**DISEÑO Y APLICACIÓN DE DISOLVENTES Y ADSORBENTES  
SUPRAMOLECULARES PARA LA EXTRACCIÓN DE  
CONTAMINANTES EN ALIMENTOS Y MUESTRAS AMBIENTALES**

LA DIRECTORA,

A handwritten signature in blue ink that reads "Soledad Rubio". The signature is written in a cursive style with a long horizontal line extending from the end.

**Fdo. S. Rubio Bravo**

Catedrática del Departamento de Química Analítica  
de la Universidad de Córdoba

*Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias*

LA DOCTORANDA,

A handwritten signature in blue ink that reads "Ana Mª Ballesteros Gómez". The signature is written in a cursive style with a long horizontal line extending from the end.

**Fdo.: Ana Mª Ballesteros Gómez**  
Licenciada en Ciencias Ambientales





**TÍTULO DE LA TESIS:** DISEÑO Y APLICACIÓN DE DISOLVENTES Y ADSORBENTES SUPRAMOLECULARES PARA LA EXTRACCIÓN DE CONTAMINANTES EN ALIMENTOS Y MUESTRAS AMBIENTALES

**DOCTORANDO/A:** ANA MARÍA BALLESTEROS GÓMEZ

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**  
(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Las investigaciones que se incluyen en esta Tesis Doctoral son de interés en el ámbito de la Química Analítica Supramolecular y han permitido profundizar en el conocimiento y aplicación de los sistemas supramoleculares en procesos de extracción. Dos fueron los objetivos científicos que se plantearon al inicio de la Tesis y en ellos se ha centrado la labor de la doctoranda Dña. Ana María Ballesteros durante el desarrollo de la misma. El primero fue profundizar en el conocimiento de los disolventes supramoleculares constituidos por agregados de agregados inversos de ácidos carboxílicos y extender su aplicación al desarrollo de métodos rápidos para el análisis de contaminantes emergentes y prioritarios en muestras ambientales y de alimentos. El segundo objetivo fue el diseño, síntesis y caracterización de nuevos disolventes y adsorbentes supramoleculares con propiedades programadas para cumplir funciones específicas y el estudio de su aplicabilidad en procesos de extracción.

En relación al primer objetivo, las investigaciones realizadas han permitido avanzar en la predicción de las propiedades de los disolventes

supramoleculares que son relevantes en procesos de extracción. En concreto, se han derivado expresiones matemáticas que permiten predecir los factores de preconcentración que pueden alcanzarse, el comportamiento de los disolventes frente a los macrocomponentes presentes en las muestras y el tipo de agregación de las moléculas anfífilicas en el disolvente. Este conocimiento ha facilitado el desarrollo y optimización de cuatro métodos analíticos para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, compuestos perfluorados, ocratoxina A y bisfenol A, F y los correspondientes éteres diglicidílicos en aguas ambientales y alimentos líquidos.

Con respecto al segundo objetivo, se han descrito nuevos disolventes supramoleculares que presentan morfología hexagonal inversa y en los que el tamaño de las gotas de coacervado, la microestructura interna y la composición puede programarse en función de la composición de la mezcla THF y agua en la que se lleva a cabo la autoasociación de las moléculas de los alcoholes alifáticos. La estructura y composición es reversible, modificándose con las condiciones ambientales. Se trata por tanto de sistemas adaptativos. Se han aplicado como materiales de acceso restringido y a la determinación de clorofenoles cancerígenos en aguas superficiales. Asimismo, se ha propuesto por primera vez el adsorbente de hemimicelas de alquilcarboxilatos quimiadsorbidas sobre nanopartículas magnéticas para llevar a cabo extracciones en fase sólida dispersa. La síntesis propuesta es simple y los extractos obtenidos no contienen tensioactivo, gracias a la naturaleza irreversible de los agregados, facilitando así el posterior acoplamiento con técnicas de separación/detección.

Como resultado de estas investigaciones se han realizado las siguientes publicaciones, de las que se detalla la posición que ocupa la revista en el área de Química Analítica [1 artículo Anal. Chem. (3/70); 2 artículos J. Chromatog. A (4-6/70), 1 artículo Anal. Chim. Acta (10/70), 1 artículo enviado para su publicación a Anal. Chem. (Septiembre 2011)]. Asimismo, fruto de la estancia realizada por la Doctoranda en el *Institute of Environmental Studies* de la Universidad *Vrije* de Amsterdam (Holanda) se puso a punto un

método para la extracción de compuestos perfluorados en alimentos con mezclas THF:agua en matrices alimentarias (1 artículo J. Chromatogr. A). Paralelamente, la doctoranda ha participado en la publicación de 3 artículos de revisión (Anal. Chem.; J. Chromatogr. A; Anal. Chim. Acta) y 2 capítulos de libro en editoriales internacionales, todos realizados por invitación.

La Doctoranda 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.

Teniendo en cuenta la originalidad y extensión del trabajo de investigación realizado y la formación adquirida por Dña Ana María Ballesteros Gómez durante la realización de la Tesis Doctoral, la directora de este trabajo autoriza su presentación.

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

Córdoba, a 18 de Octubre de 2011

Firma del/de los director/es

A handwritten signature in blue ink that reads "Soledad Rubio". The signature is written in a cursive style and is underlined with a blue line.

Fdo.: SOLEDAD RUBIO BRAVO





Mediante la defensa de esta memoria se opta a la obtención de la mención de “Doctorado Europeo” habida cuenta de que la doctoranda reúne los requisitos exigidos:

1. La doctoranda ha realizado una estancia 3 meses y medio en el *Institute for Environmental Studies of the Vrije University of Amsterdam* (Holanda), que han contribuido a su formación y han permitido desarrollar parte del trabajo de investigación que se presenta en esta Memoria.
2. Parte de la Tesis Doctoral, en concreto el objeto, resumen y conclusiones, se han redactado en una de las lenguas oficiales de la Unión Europea distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España
3. Cuenta con informes favorables de dos doctores pertenecientes a instituciones de enseñanza superior o institutos de investigación de países europeos distintos a España.
4. Uno de los miembros del tribunal de evaluación de la Tesis pertenece a un centro de enseñanza superior de otro país europeo.



...*A mi padre*, por haberme transmitido un gran entusiasmo por la ciencia ...ya desde peque, llevándome a contar cromosomas y a rescatar embriones los sábados, por haberme animado luego a hacer una tesis y a no tener miedo a moverme a otros países para ganar experiencia...

...por haber sido una brújula que me ha guiado en todo momento y en todos los sentidos y sin lo cual no hubiera seguido este camino...

...Espero que te llegue allá donde estés



I would like to thank Dr. Stefan van Leeuwen and Dr. Jacob de Boer for offering me the opportunity to work at the Department of Chemistry and Biology of the Institute of Environmental Studies (IVM) at the Vrije University of Amsterdam. I am very grateful for their collaboration and support during my stay.



Agradezco al Ministerio de Ciencia e Innovación la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) que me ha posibilitado la dedicación a esta Tesis Doctoral durante los últimos cuatro años.





## *Mi más sincero agradecimiento*

...a mi Directora de Tesis, Sole, por ser siempre una guía y referente en estos cuatro años de búsqueda, por la amplia y diversa formación que me ha brindado, las innumerables discusiones científicas de las que he disfrutado mucho y la libertad a la hora de tomar decisiones e iniciar nuevos proyectos...gracias por estos cuatro años de duro entrenamiento que me hacen sentirme preparada para atreverme a continuar por el arduo camino del investigador.

...a las profesoras Mariló y Loreto y a Diego, por su ayuda y disponibilidad durante este periodo, también a Lola que me acompañó en una primera etapa y a Miguel, por su disponibilidad y palabras siempre amables y valiosas.

...Y por supuesto a mis compañeros de laboratorio con los he compartido tantas horas durante estos años, por su ayuda y consejos y sobre todo por las risas y ánimos en los momentos bajos. En especial agradezco a Sergio y Noelia L., con los que he colaborado directamente durante largo tiempo, a haberme enseñado a aprender y a disfrutar enseñando. Y al resto del equipo: los más veteranos...Paco, Ester y Noelia C., Carmen y los nuevos... Ana Belén, Salatti, Kawtar, Ray ...y a los que ya no están pero de los que conservo un grato recuerdo Amalia, Casi, Javi, Mari Cruz y Mercedes ...y a los que aún estando un poco más lejos también me han ayudado mucho Antonio S. y Juan G.

...Ook dank aan mijn mentor in Amsterdam, Stefan en leraar Jacob en natuurlijk ook aan mijn laboratorium colegas die het verblijf veel aangenamer maakten, Bert, Gerda, Ike, Jacco, Petra, Sicco, met speciaal aandacht aan Kees, Martin, Eszter en Willem.



Y por supuesto *agradecimientos* a toda mi familia por haberme apoyado, ayudado y aconsejado en todo momento

...A mi *madre* sobre todo y por TODO

...A mis hermanos Joaquín y Helena...y adoptivos Inma y Rafa y J.R. y mi tía Rafi...y a mis abuelos, que ya no están pero siguen ahí de algún modo

...a *Pilar*, por haberme sostenido y animado en la mayor parte de esta etapa, mientras se cruzaron nuestros caminos

...a mis tres sobris Luna, Juan y Hendrie por desordenarlo todo y llenarme de energía positiva

...a todos los amigos que no he citado pero que están ahí apoyándome cuando me he perdido y a los que me han roto los esquemas para bien o mal y me han obligado a despertar y reinventarme...



*...Cuando deseas algo con todas tus fuerzas, el Universo entero  
conspira para que lo consigas*

Paulo Coelho, el Alquimista



# ÍNDICE

---

<b>OBJETO</b> .....	1
<b>AIM</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	9
<b>SUMMARY</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1. Química analítica supramolecular .....	15
1.1. Aspectos generales .....	15
1.2. Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje en sistemas supramoleculares .....	19
1.3. Solubilización de compuestos en los sistemas supramoleculares ..	23
2. Sistemas supramoleculares en extracciones analíticas .....	25
2.1. Disolventes supramoleculares (SUPRASS) .....	26
2.1.1. Síntesis de suprass mediante fenómenos de autoensamblaje ..	29
2.1.2. Propiedades de los disolventes supramoleculares .....	32
2.1.3. Formatos de extracción .....	36
2.1.4. Compatibilidad con técnicas de separación y detección .....	40
2.1.5. Aplicaciones analíticas .....	43
2.2. Adsorbentes supramoleculares .....	49
2.2.1. Formación del adsorbente supramolecular: isothermas de adsorción .....	50
2.2.2. Características de los adsorbentes supramoleculares como extractantes .....	54
2.2.3. Formatos de extracción .....	56
2.2.4. Compatibilidad con técnicas de separación y detección .....	59
2.2.5. Aplicaciones analíticas .....	59
<b>BLOQUE I: metodologías rápidas para el análisis de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales y de alimentos</b> .....	67
1. Objeto .....	67
2. Marco legislativo de la contaminación química ambiental y alimentaria .....	68
3. Disolvente supramolecular de micelas inversas de ácidos carboxílicos	71
3.1. Formación del disolvente .....	71
3.2. Factores de concentración teóricos .....	75
3.3. Eficiencia de extracción .....	75



3.4. Metodología de extracción.....	77
4. Mezclas de THF: agua para la extracción de compuestos perfluorados .....	78

**CAPÍTULO 1:** Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry..... 83

**CAPÍTULO 2:** Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry..... 109

**CAPÍTULO 3:** Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods ..... 137

**CAPÍTULO 4:** Tetrahydrofuran–water extraction, in-line clean-up and selective liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of perfluorinated compounds in food at the low picogram per gram level..... 171

**BLOQUE II:** metodologías rápidas para el análisis de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales y de alimentos..... 204

1. Objeto .....	204
2. Microestructura de los SUPRASs.....	205
3. Composición de los SUPRASs.....	208
4. Adsorbentes supramoleculares magnéticos .....	210

**CAPÍTULO 5:** Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants ..... 219

**CAPÍTULO 6:** Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants ..... 259

**RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....** 287

1. Objetivos generales .....	287
2. Tipos de muestras y analitos estudiados.....	288

3. Sistemas de extracción propuestos .....	292
3.1. Sistemas supramoleculares .....	292
3.2. Mezcla de disolventes tetrahidrofurano(THF)-agua .....	296
4. Pre-tratamiento y conservación de la muestra .....	297
5. Optimización, características analíticas y validación de los métodos propuestos.....	299
5.1. Selección del sistema de extracción .....	299
5.2. Optimización de las variables experimentales.....	300
5.3. Características analíticas del método .....	300
5.3.1. Sensibilidad .....	300
5.3.2. Selectividad .....	301
5.3.3. Precisión.....	301
5.4. Validación en muestras reales .....	301
6. Sistemas de separación-detección empleados .....	302
7. Métodos rápidos de extracción basados en SUPRASs de micelas inversas de ácidos carboxílicos .....	305
7.1. Metodología de extracción.....	305
7.2. Optimización del método .....	305
7.2.1. Diagramas de fases .....	305
7.2.2. Optimización de las variables experimentales. ....	308
7.2.3. Características analíticas de los métodos propuestos .....	313
7.2.4. Análisis de muestras reales .....	314
8. Mezclas de THF: agua para la extracción de compuestos perfluorados en alimentos a niveles de ultra-traza .....	318
8.1. Metodología de extracción.....	318
8.2. Extractante .....	321
8.3. Limpieza de la muestra .....	324
8.4. Selectividad.....	326
8.5. Características analíticas del método .....	328
8.6. Análisis de alimentos.....	330
9. Disolventes supramoleculares programables basados en agregados inversos de alcoholes alifáticos. Caracterización y potencial como materiales de acceso restringido y extractantes mixtos .....	331
9.1. Volumen y composición de los SUPRAS.....	332
9.2. Microestructura de los SUPRAS .....	333
9.3. Evaluación del SUPRAS como material de acceso restringido en la extracción de compuestos polares y clean-up de macromoléculas.....	336
9.4. Evaluación del SUPRAS como extractante mixto de compuestos apolares y de mediana polaridad .....	339
10. Adsorbentes hemimicelares formados por alquilcarboxilatos quimiadsorbidos sobre nanopartículas magnéticas.....	344

10.1. Metodología de extracción .....	344
10.2. Síntesis y propiedades del nanomaterial .....	345
10.3. Características analíticas del método.....	348
10.4. Análisis de muestras reales .....	349

<b>CONCLUSIONES</b> .....	351
---------------------------	-----

<b>CONCLUSIONS</b> .....	357
--------------------------	-----

<b>APÉNDICE A.</b> Publicaciones científicas derivadas de esta Tesis Doctoral.....	363
---	-----

<b>APÉNDICE B.</b> Artículos de revisión y capítulos de libro .....	365
---	-----

<b>APÉNDICE C.</b> Comunicaciones a congresos .....	366
---	-----

## **OBJETO**

El tratamiento de muestras continúa teniendo un papel primordial en análisis químico y constituye una de las claves para el desarrollo de procesos analíticos respetuosos con el medio ambiente. En las dos últimas décadas, se ha realizado un enorme esfuerzo en I+D+I para el desarrollo de procesos de extracción y purificación de muestras que sean más económicos, rápidos, simples, eficientes, seguros y ecológicos. Uno de los objetivos que ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de extracción ha sido la reducción del consumo de disolventes orgánicos. Esta reducción es prioritaria en los procesos industriales y analíticos, ya que los disolventes orgánicos son los responsables de aproximadamente el 55% de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles en Europa y éstos contribuyen en gran medida a la contaminación química de la atmósfera. Entre las estrategias desarrolladas para la reducción del consumo de disolventes orgánicos en los laboratorios de análisis químico destacan la adsorción de solutos sobre sólidos, la miniaturización y el uso de energías auxiliares. Asimismo, se ha prestado atención al uso de disolventes alternativos, principalmente los fluidos supercríticos y, más recientemente, los líquidos iónicos.

El objeto de las investigaciones que se presentan en esta Memoria ha sido el diseño, síntesis, desarrollo, caracterización y/o aplicación de materiales nanoestructurados en procesos de extracción analíticos, utilizando sustancias anfífilas como componentes y el autoensamblaje como ruta sintética. El objetivo último ha sido el desarrollo de metodologías competitivas para la determinación de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales y agroalimentarias.

Los materiales objeto de estudio han sido disolventes y adsorbentes supramoleculares que, independientemente del estado en el que se encuentran, presentan un conjunto de características comunes de gran

relevancia para los procesos de extracción, entre las que destacan las siguientes:

- Los agregados que constituyen los materiales supramoleculares tienen estructura tridimensional y presentan regiones de diferente polaridad que muestran una excelente capacidad de solvatación para una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos y la capacidad para actuar como multiligandos debido a la presencia de múltiples grupos polares.
- La síntesis de las estructuras tridimensionales que conforman los agregados se produce de forma espontánea y, por lo tanto, está al alcance de cualquier laboratorio.
- Las propiedades de los materiales pueden modificarse variando el grupo polar o la cadena hidrocarbonada, lo que les confiere una gran versatilidad. Dado el elevado número de compuestos anfífilos naturales y sintéticos disponibles, estas modificaciones pueden realizarse de forma simple.
- Presentan baja volatilidad e inflamabilidad, lo que hace que los procesos de extracción sean menos contaminantes y más seguros.
- Se adaptan a los formatos convencionales y miniaturizados de extracción.

Con esta premisa, los objetivos específicos de los trabajos de investigación realizados han sido:

1. ***Diseño, síntesis y caracterización de disolventes supramoleculares y adsorbentes hemimicelares con propiedades programadas para que cumplan funciones específicas.*** Las propiedades y funciones sobre las que se centrarán las investigaciones son dos: a) *Agregados monodispersos de tamaño programado*, mediante la selección de las condiciones ambientales donde se produce el autoensamblaje. Esta propiedad es de interés no sólo para el desarrollo de materiales que permitan estrategias de extracción basadas en

exclusión por tamaños confiriendo cierta selectividad a los procesos de extracción, sino para otras áreas como el microencapsulamiento de ingredientes funcionales; b) *Agregados con propiedades magnéticas*, utilizando nanopartículas de magnetita para conferir magnetismo al material. De especial interés es el desarrollo de adsorbentes supramoleculares irreversibles magnéticos, un aspecto inexplorado hasta la fecha.

2. ***Desarrollo de estrategias innovadoras para la microextracción de compuestos orgánicos en análisis agroalimentario y ambiental.*** Tanto los materiales desarrollados como los sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación se aplicarán a la extracción de compuestos con muy diferentes propiedades físico-químicas, estructuras y funcionalidades a partir de una gran variedad de muestras de naturaleza líquida o sólida. Se prestará especial atención a la extracción de compuestos orgánicos prioritarios y emergentes incluyendo compuestos con actividad estrogénica y/o cancerígena, compuestos perfluorados, etc. Estas investigaciones deberían permitir obtener una visión general de la aplicabilidad real de los materiales supramoleculares desarrollados en procesos de extracción analítica.

Paralelamente, la formación de la doctoranda mediante el desarrollo de actividades complementarias a la labor investigadora, como la publicación de artículos científicos y la asistencia y presentación de comunicaciones a congresos, constituye un objetivo fundamental en el desarrollo de esta Tesis.



## *AIM*

Sample preparation continues playing a crucial role in analytical methods and is the key step in developing environmentally friendly processes. During the last two decades, the research community has made an effort to develop more efficient, cheaper, faster, simpler and green sample preparation, extraction and clean-up methods. One of the main targets is the reduction of organic solvents volumes used for extraction. This becomes a priority provided that about 55% of organic volatile compounds emissions, which are major contributors to air pollution, come from the use of organic solvents in industrial and laboratory processes. The most common strategies to reduce the use of organic solvents at the laboratory scale have been solid-phase extraction, miniaturization and the use of auxiliary energies. The replacement of organic solvents by alternative solvents, mainly supercritical fluids and, more recently, ionic liquids, have received special attention.

The main focus of the Thesis has been the design, synthesis, development, characterization and/or application of new nanostructured materials made up of surfactants and synthesized by self-assembly for analytical extraction processes. A variety of competitive methodologies for the determination of priority and emergent contaminants in environmental and food samples are presented. The extractant materials studied consisted in supramolecular solvents and adsorbents, both featuring key properties for analytical extraction processes:

- The tridimensional aggregates making up the supramolecular solvents and adsorbents have regions of different polarity offering a high solvation power for a variety of organic and inorganic contaminants and possess multiligand ability due to the presence of multiple polar groups, thus amplifying the extraction efficiency.
- The synthesis through a self-assembly process is simple and so at the reach of every laboratory.



- The properties of the materials can be modified by selecting appropriate functional groups or carbon chain length in the amphiphile, providing them with a great versatility. Due to the ubiquity of amphiphilic compounds in nature and industry these modifications are done easily.
- They have a low volatility and inflammability, making easier the implementation of safer and environmentally-friendly procedures.
- They can be used in conventional and miniaturized extraction formats.

In this context, the concrete objectives of the Thesis have been the followings:

1. ***Design, synthesis and characterization of supramolecular solvents and hemimicelar adsorbents programmed with key properties for extraction.*** These properties and functions are two: a) *Monodisperse aggregates of programmed size*, obtained by selection of environmental conditions in the self-assembly process. This property is useful for the development of restricted access materials for providing extraction with some degree of selectivity, but also interesting for other research areas as the microencapsulation of drugs; *Aggregates with magnetic properties*, by using magnetic nanoparticles. The irreversibility of the aggregates making up the magnetic supramolecular adsorbent is an interesting aspect for extraction not investigated before.
2. ***Development of novel microextraction methods for the analysis of organic compounds in agrifood and environmental samples.*** The new materials developed and other ones previously reported by our research group are applied to the extraction of organic contaminants with different physico-chemical properties, structures and functionalities and from a variety of liquid and solid samples. Special attention is given to endocrine disruptors and/or carcinogenic activity and emergent contaminants such as perfluorinated compounds. These studies

offer a general view of the real applicability of supramolecular solvents and adsorbents in analytical extraction processes.

At the same time, the complementary formation of the PhD student by the publication of results as research articles in international journals and the attendance and contributions to research conferences has been other basic objective of this Thesis.



## CONTENIDO

El contenido de la Memoria de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en dos bloques, precedidos de una Introducción en la que se desarrollan aspectos teóricos y prácticos de interés para la síntesis, caracterización y aplicación de los disolventes y adsorbentes supramoleculares en procesos de extracción analíticos.

Los contenidos de los dos bloques en los que se ha dividido esta Memoria son los siguientes:

***BLOQUE I: Métodos rápidos para el análisis de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales y alimentos.*** En esta sección se incluye una breve introducción en la que se comenta el marco legislativo Europeo relativo a los contaminantes determinados en aguas y alimentos (hidrocarburos policíclicos aromáticos o PAHs; bisfenol A, F y éteres diglicídicos, ocratoxina A y compuestos perfluorados o PFCs) y se describen las características de los sistemas extractantes utilizados, que consistieron en disolventes supramoleculares constituidos por agregados inversos de ácidos carboxílicos y mezclas binarias de THF y agua. A continuación se presentan en cuatro capítulos los resultados de las investigaciones llevadas a cabo. En los tres primeros capítulos se profundiza en el conocimiento de los disolventes supramoleculares de agregados inversos de ácidos carboxílicos y se establecen tres metodologías de microextracción líquido-líquido para la determinación de PAHs, ocratoxina A y un grupo de bisfenoles en matrices acuosas ambientales y en alimentos líquidos. En el último capítulo, se propone la extracción de compuestos perfluorados en un intervalo amplio de polaridad usando una mezcla de THF:agua en la que los PFCs forman agregados inversos. Todas las metodologías desarrolladas permiten la determinación de los contaminantes prioritarios implicados al nivel exigido por la legislación vigente y la de los

contaminantes emergentes al nivel recomendado para evaluar la exposición humana a los mismos.

***BLOQUE II: Diseño, síntesis y estudio de nuevos disolventes y adsorbentes supramoleculares.*** La sección comienza con una breve introducción en la que se recogen los antecedentes bibliográficos sobre la microestructura de los disolventes supramoleculares y las técnicas de caracterización más usadas. Asimismo, se describen las ventajas y aplicaciones más recientes de las nanopartículas magnéticas en procesos de extracción en fase sólida dispersiva. Se describe un nuevo sistema supramolecular compuesto de agregados inversos de alcoholes alifáticos en términos de composición y microestructura con el fin de obtener disolventes autoensamblados con tamaño de agregado y composición definidos, ambas propiedades clave en procesos de extracción, que no han sido descritos hasta la fecha para este tipo de disolventes. En segundo lugar, se propone por primera vez el adsorbente de hemimicelas de alquilcarboxilatos quimiadsorbidas sobre nanopartículas magnéticas para llevar a cabo extracciones en fase sólida dispersa. La síntesis propuesta es simple y los extractos obtenidos no contienen tensioactivo, gracias a la naturaleza irreversible de los agregados, facilitando así el posterior acoplamiento con técnicas de separación/detección.

A continuación, se incluye en la Memoria una sección donde se discuten de forma global los resultados de esta Tesis, destacando los aspectos más innovadores de las investigaciones realizadas, y por último se presentan las conclusiones obtenidas.

Finalmente, se incluyen los siguientes anexos: (A) artículos de investigación publicados en revistas internacionales derivados de las investigaciones realizadas dentro del contexto de la Tesis, (B) artículos de revisión y capítulos de libro, por invitación, relacionados con los tópicos tratados en esta Tesis y (C) contribuciones tipo oral y póster a Congresos nacionales e internacionales.

## 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 aspects and applications reported for supramolecular solvents and adsorbents as a necessary background for developing new supramolecular extraction materials and testing then their analytical applicability. Main contents of two sections are summarized below.

***SECTION I: Rapid methods for the analysis of priority and emergent contaminants in environmental samples and foods.*** First, the European legislative framework of the studied contaminants is presented highlighting the need for rapid methods for compliance of legislation. Main characteristics of the extractions system employed, namely supramolecular solvents made up of inverse aggregates of carboxylic acids and binary mixtures of tetrahydrofuran and water are explained. The results of the research carried out within this section are presented in four chapters. Three first chapters go into basic aspects about formation and extraction behavior of the carboxylic acid-based supramolecular solvent. Rapid liquid-liquid microextraction methods for the analysis of PAHs, ochratoxin A and bisphenol A, F and diglycidyl ethers in environmental waters and liquid foods are proposed. In the last chapter, a method for the extraction of a wide polarity range of perfluorinated compounds based on a tetrahydrofuran:water mixture where they form inverse aggregates is described. All the methods proposed allow for determination of selected contaminants below legislative limits or, in case of emergent contaminants, below recommended levels to assess human exposure.

***SECTION II: Design, synthesis and study of new supramolecular solvents and adsorbents.*** The section starts with a brief introduction about the microstructure of supramolecular solvents and usual characterization techniques and, on the other hand, about the advantages and recent applications of magnetic nanoparticles for dispersive solid-phase extraction. A new supramolecular solvent made of inverse aggregates of fatty alcohols is

described and defined in terms of composition and microstructure with the aim of obtaining programmable self-assembled microstructured solvents with defined composition and size-tailored aggregates, both key properties for extraction processes that have not been reported before for this type of liquids. Second, the adsorbent made up of hemimicelles of carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles is proposed for the first time for a dispersive solid-phase extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. A simple synthesis procedure is proposed and free-surfactant extracts are obtained due to the irreversibility of the aggregates, thus facilitating coupling with subsequent separation/detection techniques.

This Memory includes also a part in which the results of the Thesis are discussed as a whole, highlighting the most innovative aspects of the developed research and a last part that shows the main conclusions.

Finally, the following annexes are included: (A) research articles published in international journals; (B) review articles and chapters of book, made by invitation, and related with the subjects of this Thesis and (C) poster and oral contributions to national and international Conferences.

# INTRODUCCIÓN







## 1. QUÍMICA ANALÍTICA SUPRAMOLECULAR

---

### 1.1. ASPECTOS GENERALES

La Química Supramolecular es la ciencia que estudia los sistemas formados por agregados de moléculas o iones unidos a través de interacciones intermoleculares no covalentes, tales como las interacciones electrostáticas, las fuerzas de dispersión y dipolo-dipolo, los puentes de hidrógeno y los efectos solvofóbicos. Sobre la base de estas interacciones se persigue la construcción de sistemas complejos y funcionales generados de una forma espontánea y organizada<sup>1</sup>. La Química Supramolecular es una ciencia multidisciplinar que ha surgido en la interfase de muchas otras disciplinas. Por ejemplo, son fundamentales los conocimientos desarrollados en las áreas de química orgánica e inorgánica para las síntesis de los precursores de las moléculas que se asociarán, la química física sirve de soporte para comprender las propiedades de los sistemas supramoleculares, los modelos matemáticos nos permiten predecir su comportamiento, de la biología surge la inspiración y conocimiento para el desarrollo de estos sistemas artificiales que imitan la esencia de los biosistemas, etc.

Existen tres áreas fundamentales interconectadas que han de ser consideradas en el estudio de la Química Supramolecular y que son la base para el conocimiento y diseño de la organización de la materia en sistemas progresivamente más complejos<sup>2</sup>. La primera es la del reconocimiento molecular y los fundamentos que de él se derivan (reactividad, catálisis y transporte)<sup>1,3</sup>. La segunda hace referencia al auto-ensamblaje y auto-organización y se basa en el diseño y aplicación de sistemas programados. La tercera y más emergente introduce los conceptos de adaptación al medio y evolución, que permiten el diseño de sistemas químicos adaptativos,

---

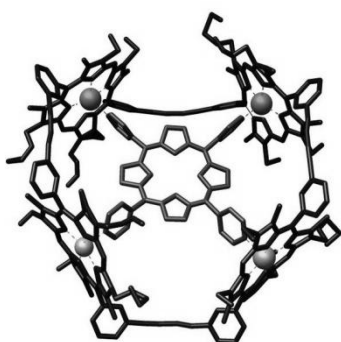
<sup>1</sup> J.M. Lehn. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, New York, 1995.

<sup>2</sup> J. M. Lehn, PNAS, 99 (2002) 4763.

<sup>3</sup> J. L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, J.M. Lehn and Vögtle, eds. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon, Oxford, 1996.

programados y dinámicos. Este último nivel pertenece a la Química Supramolecular Constitucional Dinámica<sup>4,5,6,7</sup> y se basa en la labilidad y reversibilidad de las interacciones que forman las arquitecturas supramoleculares y que les confieren la capacidad de adaptar su estructura y propiedades en respuesta a los factores ambientales. Estos niveles de complejidad creciente dan lugar a nuevas propiedades que no existen en el nivel inferior pero que son deducibles de él.

Los orígenes de la Química Supramolecular están fuertemente ligados a la química del reconocimiento molecular (*host-guest chemistry*). La química *host-guest* se basa en el estudio de grandes moléculas (*host*) con capacidad de albergar pequeñas moléculas (*guest*) a través de interacciones no covalentes específicas (ver ejemplo en Figura 1.1.aa). El autoensamblaje, en cambio, se refiere a la asociación espontánea y reversible de dos o más componentes para formar grandes agregados



**Figura 1.1.a. Complejo host-guest formado por una porfirina (guest) y un macrociclo de porfirina con cuatro átomos de Zn (host)**

que no están covalentemente unidos (ver ejemplo en Figura 1.1.a).

El autoensamblaje ocurre a una escala de complejidad mayor que la formación de complejos receptor-anfitrión. Se podría considerar que un proceso de autoensamblaje conlleva tres etapas: (i) reconocimiento molecular, (ii) crecimiento a través de un proceso secuencial y co-operativo de múltiples componentes y (iii) finalización del proceso mediante una determinada *señal de stop* que significa que el sistema ha alcanzado su completitud<sup>2</sup>.

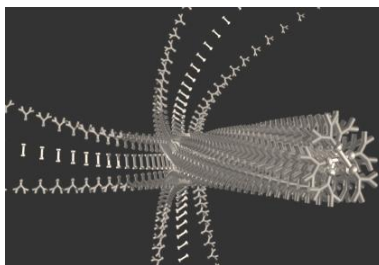
<sup>4</sup> J.M. Lehn, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (2002) 4763.

<sup>5</sup> J.M. Lehn, Science, 295 (2002) 2400.

<sup>6</sup> Fialkowski, M., K.J.M. Bishop, R. Klajn, S.K. Smoukov, C.J. Campbell, B. Grzybowski, J. Phys. Chem B. 110 (2006) 2482.

<sup>7</sup> .M. Lehn, Chem. Soc. Rev., 36 (2007) 151.

El autoensamblaje constituye el proceso fundamental para la generación de materia compleja y funcional, desde partículas hasta organismos. La posibilidad de desentrañar los mecanismos del autoensamblaje para poder dirigirlo y diseñar las arquitecturas supramoleculares deseadas constituye uno de los retos más desafiantes para la Química<sup>4</sup>. Los procesos de autoensamblaje se dirigen de forma espontánea a través de la información contenida en la red de componentes y se traducen a nivel supramolecular en una serie de interacciones y procesos de reconocimiento que dan lugar a patrones de construcción o diseño determinados. Las mismas unidades pueden dar lugar a diferentes estructuras o el proceso de autoensamblaje puede seleccionar las unidades más adecuadas de una colección, ya que el proceso de construcción se auto-dirige para elegir la estructura/estado energético más favorable en base a su carácter intrínsecamente dinámico y adaptativo.



**Figura 1.1.b. Self-assembly de un material fibroso en fase gel**

Se han diseñado materiales supramoleculares avanzados y funcionales basados en estructuras como polímeros supramoleculares<sup>8,9</sup>, cristales líquidos y vesículas<sup>10,11,12</sup> o arquitecturas construidas a partir de nanopartículas<sup>13,14,15</sup> nanotubos<sup>16,17</sup> o nanovarillas<sup>18,19</sup>. El diseño a partir de sistemas programados o autoensamblados ha proporcionado una vía de síntesis fructífera en el

<sup>8</sup> J.M. Lehn, *Prog. Polym. Sci.*, 30 (2005) 814.

<sup>9</sup> L. Brunsveld, B.J.B. Folmer, E.W. Meijer, R.P. Sijbesma, *Chem. Rev.*, 101 (2001) 4071.

<sup>10</sup> F. M. Bengler, K.D. Gabrielso, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34 (1995) 2091.

<sup>11</sup> C.M. Paleos, Z. Sideratou, D. Tsiourvas, *Chem. Bio. Chem.*, 2 (2001) 305.

<sup>12</sup> V. Marchi-Artzner, T. Gulik-Krzywicki, M.A. Guedeau-Boudeville, C. Gosse, J.M. Sanderson, J.C. Dedieu, J.M. Lehn, *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 (2004) 15279.

<sup>13</sup> C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, J.J. Storhoff, *Nature*, 382 (1996) 607.

<sup>14</sup> M. Li, H. Schnalblegger, S. Mann, *Nature*, 402 (1999) 393.

<sup>15</sup> S.J. Park, A. A. Lazarides, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2909.

<sup>16</sup> S. S. Fan, M.G. Chapline, N.R. Franklin, T.W. Tombler, A.M. Casell, H.J. Dai, *Science*, 283 (1999) 512.

<sup>17</sup> L. Adler-Abramovich, D. Aronov, P. Beker, M. Yevnin, S. Stempler, L. Buzhansky, G. Rosenman, E. Gazit, *Nature Nanotechnology*, 4 (2009) 849.

<sup>18</sup> M. Yan, H.T. Zhang, E.J. Widjaja, R.P.H. Chang, *J. Appl. Phys.*, 94 (2003) 5240.

<sup>19</sup> A. Salant, E. Amitay-Sadovsky, U. Banin, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 10006.

campo de la nanotecnología. Se han diseñado sorprendentes dispositivos tales como motores, sensores o dispositivos de almacenamiento de energía o información a escala molecular, así como nuevos fármacos con funcionalidades tales como la capacidad de reconocimiento de células cancerosas o propiedades magnéticas para su uso como agentes de contraste en técnicas médicas de diagnóstico por imagen<sup>20,21,22</sup>.

Los conceptos desarrollados en Química Supramolecular se han aplicado extensamente en el ámbito de la Química Analítica, dando lugar a la disciplina denominada Química Analítica Supramolecular. Así, moléculas del tipo anfitrión, como éteres corona y calixarenos, se han usado en extracciones líquido-líquido, separaciones cromatográficas, espectrofotometría y espectroscopia de emisión de metales<sup>23</sup>. Otra área fructífera ha sido el desarrollo de receptores sintéticos basados en interacciones *host-guest* para la producción de sensores selectivos<sup>24</sup>. Por otro lado, las ciclodextrinas y sus derivados se han usado con éxito como constituyentes de fases móviles o estacionarias para la separación de enantiómeros en técnicas cromatográficas o electroforéticas<sup>25,26</sup>.

Las moléculas que constituyen los sistemas supramoleculares contienen una parte hidrófoba y otra hidrófila o grupos donadores o aceptores de protones. Como resultado, se originan sistemas con regiones de distinta polaridad, acidez y viscosidad que determinan la capacidad de solubilización de los compuestos y los efectos que ejercen en el entorno químico. La existencia de microambientes en los agregados puede alterar la eficiencia cuántica, cambiar las propiedades físicas de las disoluciones analizadas por espectrometría atómica, modificar rutas químicas de síntesis, estabilizar

---

<sup>20</sup> J. Bath, A.J. Turberfield, DNA Nanomachines, *Nature Nanotechnology*, 2 (2007) 275.

<sup>21</sup> A. Rösler, G. W. M. Vandermeulen, H.-A. Klok, *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 (2001) 95.

<sup>22</sup> Babak Amir Parviz, Declan Ryan, and George M. Whitesides, *IEEE Trans. Adv. Packaging*, 26 (2003) 233.

<sup>23</sup> S. M. Khopkar, *Analytical Chemistry of Macrocyclic and Supramolecular Compounds*, Springer-Verlag, Berlin, 2002.

<sup>24</sup> E. V. Anslyn, *Supramolecular Analytical Chemistry*, *J. Org. Chem.*, 72 (2007) 687.

<sup>25</sup> V. Cucinotta, A. Contino, A. Giuffrida, G. Maccarrone and M. Messina, Application of Charged Single Isomer Derivatives of Cyclodextrins in Capillary Electrophoresis for Chiral Analysis, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 953.

<sup>26</sup> W. Dorothee, Chiral Silica-based Monoliths in Chromatography and Capillary Electrochromatography, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 941.

reactivos, estados de transición y productos, cambiar constantes de disociación, etc. En base a estos efectos se han desarrollado muchos procedimientos y metodologías con el uso de tensioactivos en electroanálisis y análisis espectroscópico y cinético.<sup>27,28</sup> Por otro lado, los efectos causados por solutos en determinados parámetros de los agregados supramoleculares (agregación micelar crítica o grado de enlace) se han explotado también para el desarrollo de nuevos parámetros de medida en Química Analítica<sup>29,30</sup>.

La capacidad de los agregados supramoleculares para solubilizar solutos se ha aplicado extensamente en procesos de extracción y separación analíticos.<sup>31,32</sup> La necesidad de reducir el consumo de disolvente orgánico en los laboratorios hace de estos sistemas excelentes candidatos para cumplir con este propósito. Así, en los últimos años, se han desarrollado y estudiado los fundamentos teóricos y la aplicabilidad de técnicas de extracción y concentración tales como la de punto de nube (*cloud point extraction*, CPE), ultrafiltración micelar (*micellar-enhanced ultrafiltration*, MEUF) o la extracción con adsorbentes sólidos como hemimicelas y admicelas.

## **1.2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y AUTO-ENSAMBLAJE EN SISTEMAS SUPRAMOLECULARES**

Como se ha comentado previamente, los orígenes de la Química Supramolecular están fuertemente ligados a la química del reconocimiento molecular (*host-guest chemistry*). La selectividad de las moléculas receptoras hacia una molécula anfitrión o familia de moléculas (éteres corona, ciclodextrinas, porfirinas, calixarenos, etc.) deriva de una serie de factores tales como la complementariedad de los sitios de unión, la pre-organización

---

<sup>27</sup> E. Pramauro and E. Pelizzetti, *Surfactants in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1996.

<sup>28</sup> D. Pérez-Bendito and S. Rubio, *Micellar Catalysis in Reaction-Rate Methods*, *Trends Anal. Chem.*, 12 (1993) 9.

<sup>29</sup> E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, *The Mixed Aggregate Method: a Useful Approach for the Determination of Amphiphilic Substances*, *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 241.

<sup>30</sup> R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, *Surfactant to Dye Binding Degree-Based Methodology for the Determination of Ionic Amphiphilic Compounds*, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6011.

<sup>31</sup> S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Supramolecular Assemblies for Extracting Organic Compounds*, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 470.

<sup>32</sup> F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Separation Sci.*, 28 (2005) 1613.

de la conformación de la molécula receptora y la co-operatividad de los grupos de unión. En general, para que ocurra la unión, tanto la molécula receptora como la molécula anfitrión deben poseer regiones que sean espacial y químicamente complementarias. La estabilidad de los complejos formados se favorece si la molécula receptora no requiere un cambio conformacional o si el anfitrión contiene múltiples sitios de unión covalentemente unidos. Por otro lado, los disolventes también influyen en este proceso de unión selectiva.

Los procesos de autoensamblaje o *self-assembly*, conllevan un reconocimiento menos preciso y producen sistemas más flexibles y adaptables que los complejos receptor-anfitrión. El autoensamblaje tiene lugar mediante un balance de interacciones repulsivas y atractivas que son normalmente débiles y no covalentes, aunque muchos investigadores admiten actualmente que determinados enlaces covalentes débiles (por ejemplo los enlaces de coordinación) deben también considerarse como fuerzas directoras del autoensamblaje<sup>33</sup>.

Las metodologías de análisis propuestas en esta tesis Doctoral se basan en la formación de agregados supramoleculares de compuestos anfifílicos producidos mediante procesos de *self-assembly*.

El autoensamblaje de los compuestos anfifílicos en una disolución tiene lugar cuando se alcanza una determinada concentración, que se denomina *concentración de agregación crítica* (cac), a partir de la cual comienzan a formarse estructuras ordenadas (micelas, vesículas) con el fin de minimizar los efectos solvofóbicos. En la cac la interacción entre tensioactivos es más favorable energéticamente que la interacción tensioactivo-disolvente. Así, estas estructuras surgen de un delicado balance entre interacciones soluto-soluto y soluto-disolvente<sup>34</sup>.

---

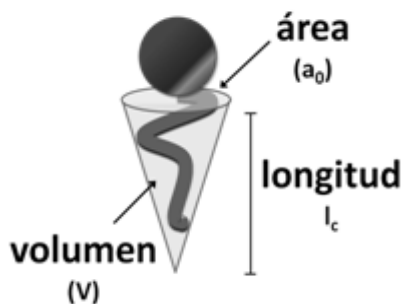
<sup>33</sup> B. Olenyuk, J.A. Whiteford, A. Fenchtenkotter, P.J. Stang, *Nature* 398 (1999) 796.

<sup>34</sup> J.W. Steed, D.R. Turner, K.J. Wallace, *Core concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, John Wiley & Sons, Chichester (2007), Chapter 1. pp. 1-27.

La morfología del agregado supramolecular depende de la relación entre el tamaño del grupo polar y la cadena hidrófoba del tensioactivo y puede predecirse por la siguiente ecuación desarrollada por Israelachvili<sup>35</sup>:

$$g = V/a_0 l$$

En esta fórmula  $g$  es el factor de empaquetamiento,  $V$  es el volumen de la cadena hidrófoba,  $a_0$  es el área media de sección que ocupa la cabeza polar en el agregado y  $l$  es la longitud de la cadena del tensioactivo (**Figura 1.2.a**). El parámetro  $g$  depende por tanto de la geometría molecular del tensioactivo y hace referencia al número de cadenas hidrocarbonadas y de átomos de carbono, el grado de saturación de la cadena y el tamaño y carga de la cabeza polar. Además, las propiedades de la disolución (pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de co-tensioactivo) están implícitamente incluidos en  $V$ ,  $a_0$  y  $l$ .



**Figura 1.2.a**

La Figura 1.2.b muestra las estructuras formadas por tensioactivos en disolución en base al valor del parámetro  $g$ . El tamaño de los agregados está determinado por una variedad de factores relacionados con las fuerzas intermoleculares, pero depende principalmente de la relación entre la longitud de la cadena hidrocarbonada y el tamaño del grupo polar.

<sup>35</sup> J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 72* (1976) 1525.




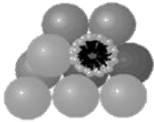

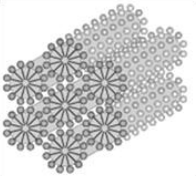

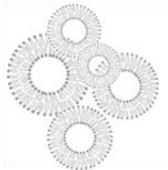

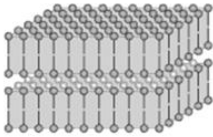

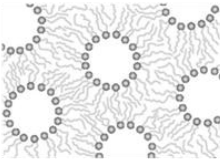
Tipo de agregado	Parámetro de empaquetamiento	Geometría del anfifilo	Estructura del agregado
Micelas esféricas	$\frac{V}{a_a l_c} < \frac{1}{3}$		
Micelas cilíndricas	$\frac{1}{3} < \frac{V}{a_a l_c} < \frac{1}{2}$		
Bicapas o vesículas flexibles	$\frac{1}{2} < \frac{V}{a_a l_c} < 1$		
Bicapas planas	$\frac{V}{a_a l_c} \sim 1$		
Micelas inversas	$\frac{V}{a_a l_c} > 1$		

Figura 1.2.b. Estructuras de los agregados supramoleculares de tensioactivos en función del valor del factor de empaquetamiento  $g$

### **1.3. SOLUBILIZACIÓN DE COMPUESTOS EN LOS SISTEMAS SUPRAMOLECULARES**

La solubilización de compuestos en los sistemas supramoleculares, que están considerados como una pseudofase, constituye la base para su aplicación en procesos de separación. Los solutos pueden interactuar con las moléculas anfitrión o los sistemas supramoleculares a través de una serie de interacciones no covalentes que comprenden un amplio intervalo de energías de enlace (ión-ión: 200-300 kJ mol<sup>-1</sup>, ion-dipolo: 50-200 kJ mol<sup>-1</sup>, dipolo-dipolo: 5-50 kJ mol<sup>-1</sup>, puente de hidrógeno: 4-120 kJ mol<sup>-1</sup>, catión- $\pi$ : 5-80 kJ mol<sup>-1</sup>,  $\pi$ - $\pi$ : 0-50 kJ mol<sup>-1</sup>, dispersión < 5 kJ mol<sup>-1</sup>).

Los sistemas supramoleculares son intrínsecamente dinámicos debido a la labilidad de las interacciones que conectan sus componentes moleculares. El tiempo de residencia de un monómero de tensioactivo en una micela es de microsegundos. La asociación de los solutos con los sistemas supramoleculares es también un proceso dinámico, así el tiempo de residencia de los solutos en micelas acuosas es del orden de 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> s<sup>-1</sup> mientras en ciclodextrinas es de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> s<sup>-1</sup>.

Existen numerosos parámetros que determinan la magnitud y distribución de la solubilización de solutos en los sistemas supramoleculares. En las micelas acuosas la localización de los solutos depende de su hidrofobicidad y la naturaleza del tensioactivo. Las especies iónicas con carga opuesta al grupo polar del tensioactivo pueden enlazarse fuertemente a éste mediante interacciones iónicas. Las especies no polares que contienen electrones polarizables, como grupos aromáticos, residen preferentemente cerca de los grupos polares. Sólo las moléculas muy apolares entran en el interior de la micela acuosa gracias a su pequeño volumen, ya que la entrada a esta región supone alterar el empaquetamiento de los residuos apolares del tensioactivo. Por otro lado, los compuestos con carácter anfífilico pueden interactuar de una forma especial con los agregados, alineándose de forma que su grupo polar quede orientado hacia la cabeza polar del tensioactivo mientras la

cadena hidrófoba se dirige hacia el interior apolar de la micela acuosa, formándose así agregados mixtos.

La solubilización de compuestos en complejos anfitrión-huésped está más restringida en polaridad y tamaño. Así por ejemplo en las ciclodextrinas se solubilizan compuestos en su cavidad hidrófoba interior (hidrocarburos, aminas, ácidos carboxílicos), donde quedan encapsulados formando complejos de inclusión.

Aunque no hay uniformidad en cuanto a las definiciones de coeficientes de partición o constantes de equilibrio que representen la solubilización de compuestos en agregados supramoleculares, el procedimiento más común desde un punto de vista analítico, es calcular el coeficiente de distribución (D), que representa la proporción de analito que ha pasado de la fase acuosa a la fase rica en tensioactivo y viene dado por la expresión  $D = [A]_{ss}/[A]_w$ , donde  $[A]_{ss}$  y  $[A]_w$  representan la concentración final de analito en el sistema supramolecular y en la fase acuosa en equilibrio, respectivamente. También es posible relacionar la solubilización con las constantes de equilibrio para la reacción



donde la transferencia de soluto al sistema supramolecular está representada como un fenómeno de enlace, para el que la constante de equilibrio es

$$K_s = [\text{tensioactivo-solutio}]_{ss} / [\text{tensioactivo}]_{ss} [\text{solutio}]_w$$

Los paréntesis indican concentraciones molares con respecto al volumen total de disolución.

## 2. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES EN EXTRACCIONES ANALÍTICAS

---

Los sistemas supramoleculares presentan elevada capacidad para solubilizar una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, debido a que ofrecen microambientes de distinta polaridad y múltiples sitios de unión. Estas propiedades han permitido su uso en procesos de separación en análisis químico y el desarrollo de metodologías analíticas en las que se reduce o elimina el consumo de disolventes orgánicos.

Los sistemas supramoleculares más utilizados hasta la fecha en procesos de extracción han sido: micelas acuosas para ultrafiltración (*micellar-enhanced ultrafiltration, MEUF*); micelas inversas solubilizadas en disolventes orgánicos para extracciones líquido-líquido (*reverse micellar extraction*); separación de fases en disoluciones coloidales de tensioactivo para extracciones líquido-líquido (*cloud point, coacervation* o disolventes supramoleculares) y hemimicelas o admicelas para extracciones en fase sólida (*hemimicellar or admicellar SPE*).

En la ultrafiltración micelar, las micelas se forman en la muestra acuosa y tras la distribución del analito a las mismas, éstas se separan mediante una membrana de tamaño de poro adecuado. Esta estrategia se ha utilizado ampliamente para la eliminación de metales en aguas<sup>27,36</sup>. La extracción con micelas inversas se ha empleado sobre todo para la separación de biomoléculas, principalmente proteínas<sup>37</sup>.

Los disolventes y adsorbentes supramoleculares, ampliamente utilizados en la actualidad, son los sistemas extractantes en los que se han basado las investigaciones que se presentan en esta Tesis. A continuación se realiza una descripción pormenorizada de los mismos y se presentan las aplicaciones más interesantes desarrolladas hasta la fecha.

---

<sup>36</sup> E. Pramauro, A.B. Prevot, Recent Res. Develop. in Pure & Appl. Anal. Chem. 1 (1998) 225.

<sup>37</sup> S.H. Krishna, N.D. Srinivas. K.S. Raghavarao, N.G. Karanth, Adv. Biochem. Eng./Biotech. 75 (2002) 119.

## 2.1. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES (SUPRASs)

Un disolvente supramolecular (SUPRAS) se define como un líquido micro o nano-estructurado que se genera a partir de una disolución de moléculas anfifílicas mediante un proceso secuencial de autoensamblaje que implica las siguientes etapas (ver Figura 2.1.a):

1. Formación de agregados tridimensionales (micelas acuosas, inversas o vesículas) a partir de una disolución madre de tensioactivo.
2. Agregación de los mismos y formación de una nueva fase líquida mediante un fenómeno definido por la IUPAC como *coacervación*<sup>38</sup> dando lugar a “gotas de coacervado”
3. Floculación de las gotas dando lugar a clústeres de mayor tamaño.
4. Separación de estas gotas de menor (Figura 2.1.aa, A) o mayor (Figura 2.1.a densidad en nueva nueva fase superior con una nueva micro o nano-estructura (micelas cilíndricas, fase L<sub>3</sub> tipo “esponja”, entre otras), dando lugar al disolvente supramolecular. Este proceso de *creaming* es muy común en procesos de coacervación o formación de microemulsiones.

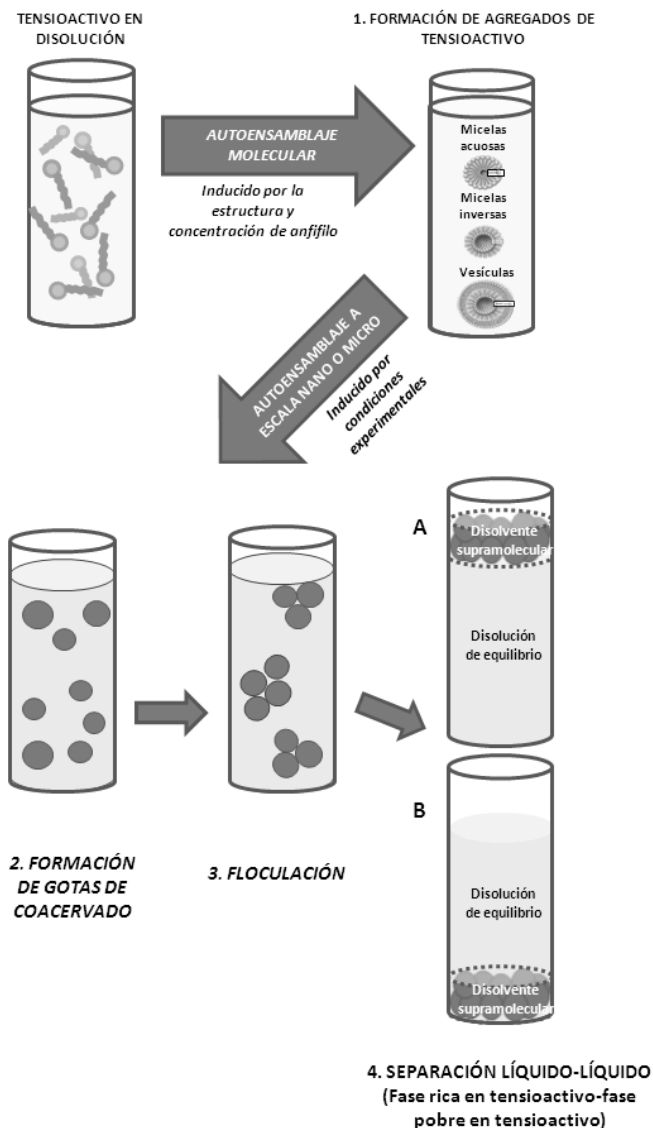
En la etapa 1 ocurre un proceso de autoensamblaje a escala molecular que está condicionado por la naturaleza y concentración del tensioactivo. Las etapas 2-4 implican un proceso de autoensamblaje a mayor escala (nano o micro) y está dirigido por las condiciones ambientales.

Los SUPRASs están constituidos por elevadas concentraciones de tensioactivo y son inmiscibles en el disolvente (normalmente agua) a partir del cual se generan, a pesar de que este disolvente sea un componente mayoritario del mismo y constituya la fase continua en la que los agregados

---

<sup>38</sup> IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972) 611

se dispersan<sup>39</sup>. La disolución que queda en equilibrio con el disolvente supramolecular contiene los monómeros de tensioactivo a la concentración de agregación crítica.



**Figura 2.1.a. Proceso de autoensamblaje en la formación de disolventes supramoleculares**

<sup>39</sup> F.M. Menger, B.M. Sykes, Langmuir 14 (1998) 4131

El término disolvente supramolecular (SUPRASs) fue propuesto recientemente por nuestro grupo de investigación como alternativa al uso de los términos utilizados tradicionalmente en la bibliografía analítica para expresar la separación de fases en disoluciones coloidales de tensioactivos, principalmente *cloud point technique*<sup>40,27,41</sup> o *coacervados*<sup>42,43</sup> (término que hace relación al fenómeno a través del cual ocurre la separación líquido-líquido o *coacervación* en estos sistemas). La razón de esta propuesta es que el término disolvente supramolecular enfatiza su carácter de disolvente y define el carácter nanoestructurado de la fase líquida formada, lo que constituyen diferencias básicas con los disolventes moleculares e iónicos. Asimismo pone de manifiesto los procesos de autoensamblaje que conllevan su formación.

Los disolventes supramoleculares presentan una serie de propiedades adecuadas para ser usados como alternativa a los disolventes orgánicos convencionales en extracciones analíticas. Entre estas propiedades destacan las siguientes: la simplicidad de los procesos de autoensamblaje utilizados para su síntesis, la ubicuidad de los compuestos anfífilos en la naturaleza y la industria, posibilitando así la selección del tensioactivo más adecuado para cada aplicación, la elevada eficacia de solvatación para distintos compuestos orgánicos e inorgánicos gracias a la presencia de regiones de diferente polaridad dentro de los agregados y la capacidad multiligando de los agregados gracias a los múltiples grupos funcionales existentes en los mismos, lo que amplifica la capacidad de extracción. Por otro lado, los disolventes supramoleculares no son volátiles ni inflamables, lo que permite la implantación de procesos más seguros.

Desde que Watanabe et al.<sup>44,45</sup> propusieron la separación de fases inducida por la temperatura en disoluciones de tensioactivos no iónicos para la

---

<sup>40</sup> J.L.Hinze, Ann. Chim. (Rome) 77 (1987) 167

<sup>41</sup> R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada, J. Chromatogr. A 902 (2000) 251.

<sup>42</sup> I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 71 (1999) 4519.

<sup>43</sup> M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1046 (2004) 147.

<sup>44</sup> H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, Bunseki Kagaku 28 (1977) 252.

<sup>45</sup> H. Watanabe, H. Tanaka, Talanta 25 (1978) 585.

extracción de solutos en procesos analíticos, los SUPRAS se han aplicado ampliamente a la extracción de compuestos orgánicos apolares y metales en muestras líquidas ambientales y biológicas<sup>46,47</sup>. En la última década se han desarrollado nuevos SUPRASs ampliando así considerablemente su campo de aplicación. Así, se han descrito SUPRASs constituidos por tensioactivos iónicos, agregados diferentes a micelas acuosas (p. ej. micelas inversas o vesículas) y SUPRASs inducidos por condiciones ambientales muy diversas, tales como cambios de pH y la adición de un electrolito o de un disolvente en el que los agregados de tensioactivo son muy poco solubles.

### ***2.1.1. Síntesis de SUPRASs mediante fenómenos de autoensamblaje***

Como se ha indicado previamente, la síntesis de SUPRASs se produce a través de fenómenos de autoensamblaje. Para que los monómeros se asocien en los agregados que constituyen las gotitas de coacervado, es necesario que se establezcan las condiciones ambientales adecuadas para que aumente el número de monómeros que se incorporan al agregado. Para ello es necesario reducir la repulsión entre los grupos polares, siguiendo estrategias que dependen de la naturaleza de estos grupos. La asociación de las gotitas de coacervado para formar clusters que tienen diferente densidad a la disolución en la que se generan, origina la insolubilidad de los mismos y su separación como una fase líquida que es el disolvente supramolecular<sup>48</sup>.

La repulsión entre los grupos polares iónicos se puede reducir añadiendo un co-tensioactivo con un grupo polar pequeño, un electrolito o un contraión anfifílico o con un cambio de pH. En sistemas no-iónicos, una manera muy efectiva de potenciar el crecimiento del agregado es reducir el número de moléculas de disolvente disponibles para la solvatación, lo cual

---

<sup>46</sup> J.F. Scamehorn, J.H. Harwell (Editors), *Surfactant-Based Separation Processes*, Marcel Dekker, New York, 1989, pp.139-154.

<sup>47</sup> W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.

<sup>48</sup> J. A. Pelesco, *Self assembly. The Science of things that put themselves together*, Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, New York, 2007, Chapter 4. pp.67-80



puede llevarse a cabo variando la temperatura o mediante la adición de un disolvente en el que el agregado es poco soluble<sup>49</sup>.

La adición de un alcohol de cadena larga como co-tensioactivo es una de las estrategias más usadas para promover el crecimiento de agregados iónicos, aunque es un método difícil de implementar, ya que con frecuencia se origina una fase lamelar en lugar del disolvente supramolecular. En el caso de la adición de un electrolito, la cantidad de sal necesaria es menor cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada. El ajuste de pH por debajo de la constante de ionización del grupo polar del tensioactivo se ha usado con éxito para la coacervación de alquilsulfatos, alquilsulfonatos, alquilbenceno sulfonatos y alquilsulfosucinatos con diferente longitud de cadena hidrocarbonada (C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>), aunque el medio extremadamente ácido necesario para producir la separación de fases (2-3 M HCl) es una desventaja significativa para el uso de estos disolventes en aplicaciones analíticas<sup>42</sup>.

En el caso de agregados no iónicos del tipo C<sub>n</sub>E<sub>m</sub> (*m* hace referencia al número de unidades de grupos de oxietileno y *n* a la longitud de la cadena hidrocarbonada), un incremento de temperatura conlleva la pérdida de agua del entorno de los grupos polares. Como consecuencia se reduce el área ocupada por el grupo polar y se produce crecimiento micelar. Por otro lado, las regiones polares de los grupos de oxietileno de micelas distintas solapan potenciando la atracción entre micelas y por tanto la separación como una nueva fase líquida.

Para micelas de tensioactivos zwitteriónicos se observa separación de fases cuando se reduce la temperatura. En este caso, debido a su carácter fuertemente polar, se podría esperar que las interacciones electrostáticas desempeñaran un papel fundamental en la formación del agregado, no obstante, estas interacciones son de corto alcance y de efectos diferentes a las que tienen lugar con tensioactivos iónicos.

---

<sup>49</sup> D.F. Evans, H. Wennerström, *The colloidal domain. Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*, Wiley-VCH, New York (1999) pp.197-198

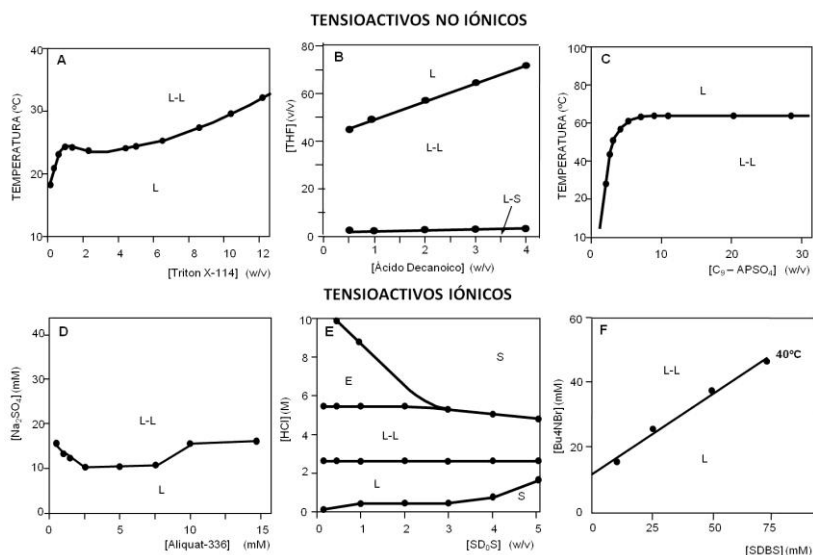
Una estrategia muy útil para la síntesis de disolventes supramoleculares a partir de tensioactivos no iónicos es utilizar una mezcla de dos disolventes miscibles en los que los agregados presentan muy diferente solubilidad. En este caso, la desolvatación de los grupos polares, con el consiguiente incremento en el tamaño de los agregados, se favorece por la interacción disolvente-disolvente que compite con la interacción disolvente-grupos polares. Un ejemplo de separación de fases causada mediante este mecanismo es la que se origina en micelas inversas de ácidos carboxílicos en tetrahidrofurano, promovida por la adición de agua<sup>50</sup>.

La Figura 2.1.b muestra las condiciones ambientales bajo las que se produce la síntesis espontánea de varios disolventes supramoleculares (regiones L-L). Las interfases en estos diagramas se modifican en función de la estructura del tensioactivo y, cuando se aplican a extracciones analíticas, de los componentes de la matriz de la muestra. Así, para una serie de homólogos de polioxietileno, la temperatura requerida para la separación de fases se incrementa a medida que disminuye el número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada<sup>51</sup>. Para mezclas de dos tensioactivos no iónicos, la temperatura requerida para la síntesis del disolvente supramolecular suele ser intermedia a la de cada uno por separado, mientras que para mezclas de un no iónico y un iónico suele ser más alta que la del primero. Por otro lado, el agua requerida para la coacervación de micelas inversas de ácidos carboxílicos en tetrahidrofurano es mayor cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo<sup>50</sup>.

---

<sup>50</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

<sup>51</sup> P. Taechangam, J.F. Scamehorn, S. Osuwan, T. Rirksomboon, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 347 (2009) 200.



**Figura 2.1.b. Diagramas de fases típicos para tensioactivos en diferentes condiciones ambientales: (a) Triton X-114 en función de la temperatura, (b) ácido decanoico en mezclas de THF:agua, (c) 3-(nonildimetilamonio)propil sulfato (C<sub>9</sub>-APSO<sub>4</sub>) en función de la temperatura, d) cloruro de tricaprilmetilamonio (Aliquat-336) en presencia de sulfato sódico, e) dodecano sulfonato sódico (SDoS) en presencia de ácido clorhídrico y f) dodecibenceno sulfonato sódico (SDBS) en presencia de bromuro de tetrabutilamonio. L designa una región de líquido homogéneo, L-L, región de separación de dos fases líquidas; E, región de emulsión; y, S, región líquido-sólido.**

### 2.1.2. Propiedades de los disolventes supramoleculares

Los SUPRASs contienen una elevada concentración de tensioactivo que forman nanoestructuras constituidas por microambientes de distinta polaridad, propiedades que les confieren una alta capacidad de solubilización para una amplia variedad de compuestos.

Todos los disolventes supramoleculares, independientemente de la naturaleza del grupo polar, proporcionan un ambiente apolar en la región hidrocarbonada de los agregados. Esta región es ideal para la extracción de compuestos no polares y está gobernada por los valores de las constantes

octanol-agua al igual que ocurre con los disolventes convencionales. Las principales fuerzas implicadas en la extracción son las fuerzas de dispersión.

La naturaleza del grupo polar en los agregados de los SUPRASs determina el tipo de compuesto polar que puede extraerse. Los grupos más frecuentemente usados en aplicaciones analíticas son los óxidos de polietileno, ácidos carboxílicos, sulfatos, sulfonatos, carboxilatos e iones de amonio y piridinio. Las interacciones involucradas en la extracción de compuestos polares incluyen las iónicas, puentes de hidrógeno y, en el caso de contener anillos bencénicos, interacciones  $\pi$ -catión y  $\pi$ - $\pi$ .

La capacidad de solubilización de los SUPRASs está influenciada por el tamaño del grupo polar y/o la cadena hidrocarbonada. Así, por ejemplo, la eficiencia de extracción para el fenol utilizando un SUPRAS constituido por tensioactivos alquiletoxilados aumenta al incrementarse el número de unidades de oxietileno debido al incremento de las interacciones dipolo-dipolo entre los grupos oxietileno del tensioactivo y los grupos hidroxilo del analito<sup>52</sup>. Por otro lado, la eficiencia de extracción para solutos muy hidrófobos, tales como tolueno o tricloroetileno, dependerá principalmente de la longitud de la cadena hidrocarbonada<sup>51</sup>.

Una propiedad significativa de los SUPRASs es su elevada capacidad de extracción para compuestos anfífilicos (tensioactivos, drogas, algunos pesticidas, etc.) mediante la formación de agregados mixtos. Las interacciones tanto de dispersión como polares gobiernan la formación de los agregados mixtos y, por tanto, su estabilidad es máxima para mezclas de tensioactivos de carga opuesta. Se han desarrollado excelentes aplicaciones de los SUPRASs para la extracción de compuestos anfífilicos. Como ejemplo se puede citar la metodología basada en el uso de un SUPRAS constituido por micelas de dodecilsulfonato para la extracción de tensioactivos catiónicos en muestras ambientales sólidas<sup>52</sup>. Esta metodología ofrece una alternativa rápida (1 hora, 40 °C, 700 rpm) a los procesos convencionales de extracción con disolventes orgánicos, los cuales conllevan un alto consumo de

---

<sup>52</sup> F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 998 (2003)143.

disolvente y sucesivas etapas que tardan en completarse alrededor de una semana.

La eficiencia de extracción de los SUPRASs depende del número de sitios de unión y de las energías de enlace que proporcionan (iónica>puentes de hidrógeno>dipolo-dipolo>dipolo-dipolo inducido>dispersión). Por otro lado, los factores de concentración reales dependen de la eficiencia de extracción y de la relación de volúmenes muestra/SUPRAS.

El volumen de SUPRAS producido depende linealmente de la cantidad de tensioactivo en disolución, al menos para concentraciones inferiores al 4% w/v, que es el intervalo interés analítico. Esta linealidad indica que la composición del disolvente no depende de la cantidad de reactivo utilizada para la síntesis. El valor de la pendiente de esta relación lineal (con unidades  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ) muestra los microlitros de SUPRAS obtenidos por miligramo de tensioactivo, de modo que aquellos SUPRASs con pendientes bajas proporcionan los mayores factores de concentración. Para SUPRASs formados por micelas inversas<sup>50</sup> y vesículas de ácidos carboxílicos<sup>53</sup> y micelas acuosas de SDS<sup>42</sup> y de Tritón X-114<sup>54</sup>, los valores inversos de la pendiente son 0.25-0.75, 1, 0.2 y 0.09  $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Sin embargo, la composición de algunos SUPRASs varía con la concentración de tensioactivo<sup>54</sup> utilizada para las síntesis. Asimismo, la modificación de las condiciones ambientales en la síntesis, por ejemplo, la variación en la temperatura<sup>41</sup>, concentración de sales<sup>55</sup>, de HCl<sup>56</sup> o de un co-tensioactivo,<sup>57</sup> puede tener influencia en la composición.

La Tabla 2.1.a muestra los factores de preconcentración teóricos que pueden obtenerse en la extracción de solutos en muestras acuosas para una variedad de SUPRASs sintetizados en diferentes condiciones ambientales.

---

<sup>53</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.

<sup>54</sup> B. Yao, L. Yang, J. *Colloid Interface Sci.* 319 (2008) 316.

<sup>55</sup> M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 2004, p. 197.

<sup>56</sup> D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 13.

<sup>57</sup> E.W. Crick, E.D. Conte, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 87.

Tabla 2.1.a. Factores de concentración teóricos de disolventes supramoleculares de micelas de tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos y de micelas inversas o vesículas de ácidos carboxílicos.					
SUPRAS	Tensioactivo	Condiciones experimentales utilizadas para la síntesis del SUPRAS	Concentración de tensioactivo (% w/v)	Factor de concentración teórico	
Micelas no-iónicas	<i>Alcoholes etoxilados (AE)</i>				
	C <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	0.8 M NaCl, 80 °C	2.9 (70 mM)	31	
	C <sub>12</sub> E <sub>6</sub>		3.2 (70 mM)	20	
	C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>		3.9 (70 mM)	12	
	C <sub>10</sub> E <sub>6</sub>		3.0 (70 mM)	24	
	C <sub>16</sub> E <sub>6</sub>		3.6 (70 mM)	5	
	Tergitol 15-S-7	0.6 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 35°C	1.0	40	
	Triton X-114		0.05	60	
		65°C	0.2	20	
			0.5	500	
		1.0	250		
	PEG/PPG-18/18 dimethicone	50°C	0.05	100	
			0.2	50	
Micelas zwitteriónicas	3-[decil-dimetilamonio] propilsulfato	35 °C	2.0	35	
Micelas de aniónicas	Dodecilsulfato sódico	4.0 M HCl	0.25	30	
			1.0	11	
			5.0 M HCl	0.25	14
	Dodecanoulfonato sódico	3.0 M HCl	1.0	8	
			0.25	50	
			4.0 M HCl	1.0	4
		0.25	117		
		1.0	23		
Micelas catiónicas	Cetrimida	6.8 M NaCl, 0.05 (% v/v) 1-octanol	0.5	5	
		6.8 M NaCl, 0.08 (% v/v) 1-octanol	0.5	35	
Micelas inversas de ácidos carboxílicos	Ácido decanoico	5 (% v/v) THF	0.2	362	
			1.0	72	
			15 (% v/v) THF	0.2	200
			1.0	40	

Vesículas de ácidos carboxílicos	Ácido octanoico	[Bu <sub>4</sub> NOH]/[Tensioactivo] = 0.5	0.1	400
			1.0	50
	Ácido decanoico		0.1	400
			1.0	69
	Ácido dodecanoico		0.1	277
			1.0	51
	Ácido tetradecanoico		0.1	208
			1.0	73

### 2.1.3. Formatos de extracción

El formato hoy en día más usado en procesos de extracción con SUPRASs es la formación in situ del disolvente en la muestra acuosa (10-100 mL), a la que se adiciona el anfifilo (0.1-2% w/v) y en la que se establecen las condiciones ambientales requeridas para coacervación. La extracción de los analitos se lleva a cabo mediante agitación magnética seguida de una etapa de centrifugación para acelerar la separación de fases. A continuación se retira el volumen total de SUPRAS o una alícuota del mismo y se analiza directamente o tras una dilución con disolvente orgánico.

La separación de SUPRASs con mayor densidad que el agua se suele hacer enfriando el tubo después de la centrifugación. De esta forma se incrementa la viscosidad del disolvente, que se adhiere a las paredes del tubo, facilitando así el desecho de la disolución de equilibrio por decantación. La mayoría de los tensioactivos no-iónicos empleados en extracción (p. ej. Triton X-114, Triton X-100, PONPE 7.5, PEG/PPG-18/18 dimethicone) y zwitteriónicos son más densos que las muestras acuosas. Sin embargo, también se han observado fases menos densas que la disolución de equilibrio para los tensioactivos alquiletoxilados con un número de unidades de oxietileno inferior a 12 en presencia de elevadas concentraciones de sal y altas temperaturas (p. ej. [NaCl]= 0.8 M y 80°C<sup>51</sup>). Asimismo, los SUPRAS constituidos por disoluciones de micelas catiónicas o aniónicas y los formados por micelas inversas o vesículas de ácidos carboxílicos son menos

denso que el agua y flotan sobre la disolución de equilibrio, lo cual facilita su separación.

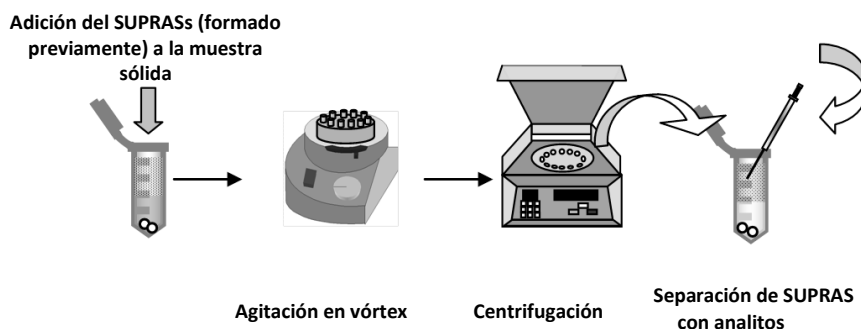
Cuando se usan tubos cilíndricos de centrífuga para el proceso de extracción, el volumen de SUPRASs generado puede calcularse fácilmente a partir de la expresión  $\pi r^2 h$ , siendo  $r$  el radio de la sección de tubo y  $h$  la altura de la columna de líquido que el SUPRAS ocupa en el mismo. En el caso de SUPRASs menos densos que el agua, la exactitud de las medidas puede mejorarse usando tubos de centrífuga en los que se ha estrechado la sección en la zona en la que se ubicará el SUPRAS y midiendo la altura con un calibre digital. Otra alternativa es extraer todo el volumen de disolvente con una microjeringa y pesarlo. La medida directa del volumen mediante una microjeringa graduada es difícil debido a la alta viscosidad de los SUPRASs, especialmente los constituidos por agregados de tensioactivos no-iónicos (p.ej. 120-200 cp para SUPRASs de Triton X-114).

La extracción de muestras sólidas (0.1-1 g) con SUPRAS se ha llevado a cabo normalmente añadiendo éstas a una disolución acuosa que contiene los componentes necesarios para generar el SUPRAS (tensioactivo, sal, temperatura, etc.). Así el soluto se distribuye en tres fases al alcanzar el equilibrio: la muestra, la disolución acuosa de equilibrio y el SUPRAS. Este formato es válido para analitos apolares de modo que el equilibrio de distribución está favorecido hacia el SUPRAS. Al mismo tiempo, la disolución de equilibrio puede retener compuestos polares de la matriz. Por esta misma razón este formato no es adecuado para compuestos muy solubles en agua, para los que se obtienen bajos rendimientos de extracción. Con este fin se ha propuesto un nuevo modo de extracción basado en la formación previa del SUPRAS y adición directa del mismo a la muestra sólida (ver Figura 2.1.c). De este modo se han conseguido extraer residuos veterinarios (flumequina y ácido oxolínico, con constantes octanol-agua de 0.94-1.5) de muestras de pescado y marisco con recuperaciones del 99-102%<sup>58</sup>.

---

<sup>58</sup> E. M. Costi, M. D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1447.

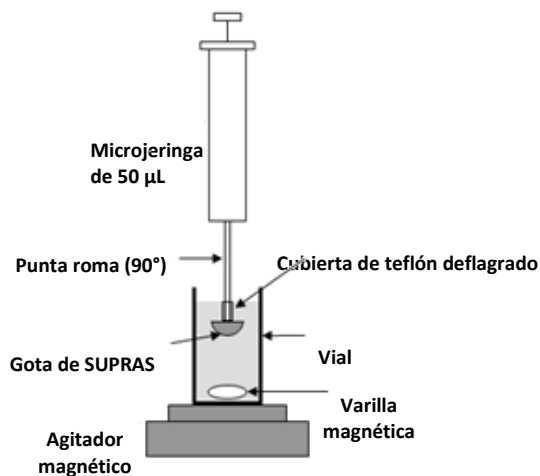




**Figura 2.1.c. Extracción directa de muestras sólidas con SUPRAS**

Los disolventes supramoleculares también se han empleado en el formato de extracción en una gota (*single-drop microextraction*, SDME)<sup>59</sup>. Para ello se han utilizado SUPRASs constituidos por vesículas de ácidos carboxílicos y se han aplicado a la extracción de clorofenoles en aguas ambientales. El dispositivo empleado se muestra en la figura 2.1.c. La formación de gotas esféricas y estables de SUPRAS en la punta de microjeringas convencionales depende del tipo de fuerzas intermoleculares que se establecen entre las cabezas polares del tensioactivo. Los puentes de hidrógeno son suficientemente estables para permitir la formación de gotas esféricas y así, los SUPRASs compuestos de ácidos carboxílicos son ideales para esta aplicación. El uso de SUPRASs en SDME constituye una alternativa ventajosa al uso de disolventes orgánicos convencionales en aplicaciones en las que los analitos son polares o cuando la determinación posterior de los mismos se realiza mediante cromatografía de líquidos.

<sup>59</sup> F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1195 (2008) 25.



**Figura 2.1.d. Dispositivo para la extracción en una gota de SUPRAS**

Además de la miniaturización, otra tendencia en la extracción con SUPRASs es la automatización. Fang et al.<sup>60</sup> fueron los primeros en utilizar el análisis por inyección en flujo (*flow injection analysis, FIA*) con este fin. En este caso la separación de fases se lleva a cabo por adición de sal en lugar de temperatura, lo cual simplifica el proceso, y se usa una columna de algodón para retener los agregados de tensioactivo del SUPRAS que contienen los analitos. La elución de los mismos se lleva a cabo con un disolvente orgánico. También se han desarrollado acoplamientos en línea a cromatografía de líquidos-fluorescencia (CL-Fl)<sup>61</sup>. Para ello, las muestras acuosas que contienen el analito y el tensioactivo (en este caso PAHs y Tergitol 15-S-7) se inyectan en la válvula de CL de seis vías y se añade sulfato amónico para producir la separación de fases. La fase rica en tensioactivo y PAHs se retiene en una columna de gel de sílice y pasado unos minutos se cambia la válvula a la posición de inyección, de modo que la fase móvil arrastra el analito y el tensioactivo al sistema de CL-Fl.

<sup>60</sup> Q. Fang, M. Du, C.W. Huie, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3502.

<sup>61</sup> C. F. Li, J.W.C. Wong, C.W. Huie, M.W.F. Choi, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 11

#### **2.1.4. Compatibilidad con técnicas de separación y detección**

Los disolventes supramoleculares se han usado principalmente en combinación con cromatografía de líquidos (CL) acoplada a detectores de UV-visible, fluorescencia y espectrometría de masas (EM). Tras la extracción se inyecta el disolvente en el sistema de CL, normalmente sin previa dilución o *clean-up*. Los agregados supramoleculares se destruyen en la fase móvil hidroorgánica y producen una elevada concentración de monómeros de tensioactivo que presentan un tiempo de retención definido de acuerdo a la polaridad del analito. Sin embargo, cuando se usan fases móviles con un alto contenido en agua (>40%), estos agregados se destruyen lentamente a lo largo del sistema cromatográfico, dando así lugar a una pseudofase donde los analitos se reparten. La introducción de este mecanismo de separación adicional, puede beneficiar o perjudicar la resolución cromatográfica de los solutos de interés. En el segundo caso, se aconseja diluir el extracto con disolvente orgánico (p. ej. a un factor 1:1) previa a su introducción en el sistema cromatográfico.

La estructura y las propiedades físico-químicas del tensioactivo son esenciales para conseguir una adecuada separación cromatográfica y posterior detección del analito. Los tensioactivos no iónicos pertenecientes a las series de Triton X (octil fenoles etoxilados) y PONPE (nonil fenoles etoxilados), que están comercialmente disponibles como una mezcla de homólogos y oligómeros, no son una buena opción para la separación/detección de compuestos de polaridad media/alta, ya que se originan picos cromatográficos muy anchos que coeluyen con los solutos de interés. Por otro lado, la presencia de anillos aromáticos en la estructura de estos tensioactivos produce elevadas señales de absorbancia. Una alternativa a esta desventaja es el uso de tensioactivos iónicos o zwitteriónicos no aromáticos, los cuales eluyen a bajos tiempos de retención, produciendo picos cromatográficos estrechos y que no absorben por encima de 210 nm. Cuando se usa espectrometría de masas, como regla general se envía a desecho la ventana de elución de tensioactivo después de la separación cromatográfica. De este modo se evita el ensuciamiento de la fuente y la

posible pérdida de eficiencia en la ionización de los solutos, lo que produce una disminución de la sensibilidad en la determinación de los mismos.

En la última década se han realizado importantes avances en el acoplamiento de las extracciones basadas en SUPRASs y el análisis por cromatografía de gases (CG). Para ello, se han desarrollado estrategias centradas principalmente en la eliminación del tensioactivo (normalmente Triton X-114) antes de la inyección. Con este propósito se han usado columnas de SPE para retener el tensioactivo y eluir los analitos (por ejemplo columnas de gel de sílice y Fluorisil en serie<sup>62</sup> para pesticidas) o viceversa, con columnas de intercambio iónico en el caso de analitos cargados como fenotiazinas<sup>63</sup>. Por otro lado se han aplicado con éxito re-extracciones líquido-líquido (*back-extractions*) del analito contenido en el SUPRASs (como PAHs o difenil éteres polibrominados) a un disolvente inmiscible en agua usando energía de microondas o ultrasonidos<sup>64,65</sup>. Recientemente se ha propuesto una nueva estrategia que no requiere la eliminación del tensioactivo que constituye el SUPRAS y se basa en la derivatización del mismo, en este caso Triton X-114, con *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida<sup>66</sup>. El pico cromatográfico correspondiente al tensioactivo derivatizado es estrecho y permite la cuantificación exacta y reproducible de una variedad de analitos como PAHs, herbicidas y profenos e incluso de analitos poco volátiles, como ibuprofeno y flurbiprofeno, que son derivatizados al mismo tiempo que el tensioactivo.

Aunque el uso de tensioactivos en electroforesis capilar (EC) es una práctica normal, como aditivos o como componentes de micelas en cromatografía electrocinética micelar (*micellar electrokinetic chromatography*, *MEKC*), el acoplamiento de extracciones con SUPRASs y CE no ha sido un área fructífera, aunque se han hecho algunos avances en la última década.

---

<sup>62</sup> A.M. Faria, R.P. Dardengo, C.F. Lima, A.A. Neves, M.E.L.R. Queiroz, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87 (2007) 249.

<sup>63</sup> A. Ohashi, M. Ogiwara, R. Ikeda, H. Okada, K. Ohashi, *Anal. Sci.* 20 (2004) 1353.

<sup>64</sup> T.I. Sikalos, E.K. Paleologos, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2544

<sup>65</sup> A.R. Fontana, M.F. Silva, L.D. Martínez, R.G. Wuilloud, J.C. Altamirano, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4339.

<sup>66</sup> Y. Takagai, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7113.

Los extractos de SUPRASs son compatibles con las fases móviles usadas en electrocromatografía capilar (*capillary electrochromatography*, CEC), ya que esta técnica es híbrida entre EC y CL. El único tratamiento requerido antes de la inyección es la dilución del extracto con un disolvente orgánico para evitar la obstrucción del capilar. Esta estrategia se ha aplicado a la determinación de PAHs, dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs) y ftalatos con fases estacionaria de C<sub>18</sub><sup>41,67</sup>. Se debe tener en cuenta que aunque las separaciones son reproducibles, los tiempos de migración pueden ser diferentes a los de los estándares, debido al recubrimiento dinámico de tensioactivo residual en la fase estacionaria.

Por otro lado se han obtenido resultados satisfactorios combinando extracciones con SUPRAS y electroforesis capilar de zona (*capillary zone electrophoresis*, CZE) mediante el uso de medios no acuosos para evitar la adsorción del tensioactivo sobre la pared del capilar<sup>68,69</sup>. Cuando por el contrario se usan disoluciones reguladoras acuosas tiene lugar la adsorción de una elevada cantidad de tensioactivo sobre la pared del capilar de sílice dando lugar a una marcada pérdida en eficiencia y reproducibilidad en cuanto a tiempos de migración y reproducibilidad en los picos electroforéticos<sup>70</sup>.

También ha sido posible la combinación de extractos de SUPRAS diluidos con disolvente orgánico y MEKC, normalmente metanol, con factores de dilución de 1.5-3 para reducir su viscosidad. De este modo se han analizado con éxito compuestos fenólicos en aguas<sup>71</sup> o verde de malaquita en pescado<sup>72</sup>.

Por último, también se han abordado estrategias para eliminar el tensioactivo antes de su introducción en CE. Así, se ha llevado a cabo la re-

---

<sup>67</sup> S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 109.

<sup>68</sup> R. Carabia-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, J. Hernández-Méndez, Anal. Chem. 71 (1999) 2468.

<sup>69</sup> R. Carabia-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, C. García Pinto, J. Hernández-Méndez, J. Chromatogr. A 1005 (2003) 23.

<sup>70</sup> Y.W. Wu, Y.Y. Jiang, T.X. Xiao, H.L. Zhang, J. Sep. Sci. 31 (2008) 865

<sup>71</sup> P.W. Stege, L.L. Sombra, G.A. Messina, L.D. Martínez, M.F. Silva, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 567.

<sup>72</sup> X. Luo, X. Jiang, X. Tu, S. Luo, L. Yan, B. Chen, Electrophoresis 31 (2010) 688.

extracción de los analitos en disolución acuosa previa derivatización para conferirles carácter hidrófilo<sup>73</sup> o basándose en sus características ácido-base<sup>74</sup>.

### **2.1.5. Aplicaciones analíticas**

Los disolventes supramoleculares se han utilizado extensamente para la extracción de metales de muestras acuosas<sup>75,76</sup>. Recientemente también se han aplicado a muestras de suelo, plantas y alimentos. Los metales pueden ser extraídos en su forma iónica nativa o después de la formación de quelatos. Una característica importante de las extracciones de metales con SUPRASs es la posibilidad de especiación de los distintos estados de oxidación, como es el caso de Cr (VI)-Cr (III) y As (III)-As (V).

Los disolventes supramoleculares constituidos por micelas acuosas de Triton X-114 han sido los más empleados en la extracción de metales, debido a que la coacervación se produce a temperatura ambiente. Este factor es importante para los quelatos y agentes quelatantes que son inestables a elevadas temperaturas. Por otro lado es creciente el uso de micelas mixtas de un tensioactivo aniónico o catiónico (como dodecilsulfato sódico, SDS; cloruro de cetilpiridinio, CPC o bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB) con Triton X-114. Estos disolventes proporcionan interacciones tanto hidrófobas como electrostáticas, muy adecuadas para la extracción de metales, ya que el grupo cargado del tensioactivo interactúa con el metal formando un complejo neutro que se extrae en la región apolar del disolvente.

Los SUPRASs constituidos por micelas acuosas de tensioactivos no-iónicos, iónicos o mixtos y micelas inversas y vesículas de ácidos carboxílicos se han aplicado con éxito a la extracción de una amplia variedad de compuestos orgánicos en muestras ambientales, biológicas y de alimentos. Al igual que ocurre con metales, los SUPRASs de agregados no iónicos han sido con diferencia los más usados. La principal razón parece ser la limitada atención que se ha prestado al desarrollo de nuevos SUPRASs. El alquilfenol

---

<sup>73</sup> W. Wei, X.B. Yin, S.W. He, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 212

<sup>74</sup> X.B. Yin, J.M. Guo, W. Wei, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1399.

<sup>75</sup> O. T. Butler, J. M. Cook, C.M. Davidson, C.F. Harrington, D. L. Miles, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 131.

<sup>76</sup> C. Bosch-Ojeda, F. Sánchez-Rojas, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 759.

etoxilado Triton X-114 continúa siendo el más usado, junto con Triton X-100 y Genapol X-080. La mayoría de las aplicaciones usan concentraciones de tensioactivo alrededor del 1%, aunque se han requerido mayores concentraciones (3-10%) para compuestos bioactivos en muestras biológicas. Estos SUPRASs no suelen proporcionar factores de concentración elevados (1-10), aunque estos valores pueden incrementarse con cantidades bajas de tensioactivo y con la adición de sales y/o incrementando la temperatura para dar lugar a fases de SUPRAS más concentradas. De este modo, se han obtenido factores de concentración de 73-152 usando 0.25% de Triton X-114 y 0.4 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 45°C para estriol, estradiol, estrona y progesterona<sup>77</sup> y de hasta 500 en extracción de residuos de filtros UV (Eusolex 232, Benzophenone-3, Eusolex 6300, Eusolex 9020, Eusolex 2292) con 0.1% de Triton X-114, 0.2M NaCl y 60°C<sup>78</sup>.

Entre los SUPRASs formados por tensioactivos iónicos los más usados en extracciones analíticas han sido los producidos en medio ácido. La principal desventaja de los mismos son las condiciones experimentales extremas que se requieren para su formación (p. ej. 3-4 M HCl o 4 g de NaCl). Sin embargo, estas condiciones, a priori no deseables, pueden ser ventajosas en ciertas aplicaciones, como la extracción de tensioactivos catiónicos de muestras de suelo, lodo y sedimentos<sup>43</sup>, ya que el medio ácido favorece la desorción del tensioactivo de la matriz mediante intercambio iónico. Estos SUPRASs permiten alcanzar factores de concentración elevados a bajas concentraciones de tensioactivo (p. ej. 140 con 0.1% of dodecano sulfonato<sup>79</sup>) y a diferencia de los no-iónicos, los tensioactivos aniónicos están comercialmente disponibles como un único homólogo y muestran tiempos de retención bajos. Estas características los hacen adecuados para su uso en espectrometría de masas, ya que los picos cromatográficos son estrechos y pueden así enviarse fácilmente a desecho después de la separación cromatográfica.

---

<sup>77</sup> L. Wang, Y.-Q. Cai, B. He, C.-G. Yuan, D.-Z. Shen, J. Shao, G.-B. Jiang, *Talanta* 70 (2006) 47.

<sup>78</sup> D. L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Lampropoulou, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 19.

<sup>79</sup> D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29.

Respecto a los SUPRASs constituidos por tensioactivos catiónicos, se han descrito algunas aplicaciones interesantes como la extracción de clorofenoles de muestras acuosas<sup>80</sup>. Por otro lado, la coacervación de micelas mixtas de tensioactivos no iónicos e iónicos, constituye una buena estrategia para la extracción de compuestos iónicos. Normalmente la mezcla se compone de Triton X-114 con los tensioactivos SDS, CTAB o CPC.

Los SUPRASs formados por micelas inversas y vesículas de ácidos carboxílicos, aunque se han descrito recientemente, han demostrado ya su versatilidad para la extracción de una amplia variedad de compuestos orgánicos como PAHs, colorantes, alteradores endocrinos, mictoxinas y sustancias bioactivas, entre otros contaminantes, en muestras ambientales (aguas naturales y residuales) y agroalimentarias. Los detectores usados en estas aplicaciones han sido UV, FI o EM. La mayor ventaja de estos SUPRASs es la elevada concentración de anfifilos que contienen (hasta 1 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ ), lo cual permite alcanzar altos factores de concentración usando bajas concentraciones de tensioactivo ( $\geq 0.5\%$ ), p. ej. 115 para ocratoxina A en vinos con SUPRASs de micelas inversas<sup>81</sup> y 769 para bisfenoles en aguas con SUPRAS de vesículas<sup>82</sup>. En la Tabla 2.1.b se muestran ejemplos significativos de aplicaciones de disolventes supramoleculares en extracciones analíticas.

---

<sup>80</sup> X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.

<sup>81</sup> S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 3-10.

<sup>82</sup> F.J Ruiz, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 269-276.



<b>Tabla 2.1.b. Aplicaciones de SUPRASs a la extracción de compuestos orgánicos en procesos analíticos (1999-2010)</b>				
<b>Analito</b>	<b>Muestra</b>	<b>Tensioactivo (%)/ Condiciones de coacervación</b>	<b>Separación- detección/Factor de concentración teórico (FCT), recuperaciones (Rs, %) y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)</b>	
<b>SUPRASs DE MICELAS ACUOSAS DE TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS</b>				
PAHs	Suelo	Tergitol 15-S-7/1% (v/v) 1.5M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	FIA-SUPRAS-CL-FL Rs: 88-105 LODs: 101-456 ng L <sup>-1</sup>	83
	Agua de mar	Polioxietilen-10-lauril éter (POLE)/ 1% (w/v) Temperatura (90°C)	CL-FL FCT: 17.6 Rs: 37.7-104 LODs: 1-150 ng L <sup>-1</sup>	84
Pesticidas	Frutas	Triton X-114/ 1.5 % (w/v) Temperatura (45°C) y NaCl (7%, w/v)	CL-UV Rs: 80-107 LODs: 0.1-1 ng g <sup>-1</sup>	85
	Orina humana	Triton X-114/ 0.14 % v/v Temperatura (50 °C) y NaCl (100 µL of saturated solution)	CG-FPD FCT: 50 Rs:85-107 LODs: 0.12-0.24 ng mL <sup>-1</sup>	86
	Arroz	Triton X-100/ 1% w/v Temperatura (50 °C) y NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> (18% w/v)	CL-Vis Rs: 88-92 LOD: 0.5 ng g <sup>-1</sup>	87
Arbidol	Plasma de rata	Triton X-114/3.7 % w/v Temperatura (45°C)	CL-UV Rs: 89.7-92.7 LOQ: 0.08 µg mL <sup>-1</sup>	88
Venlafaxina	Plasma humano	Triton X-114/5 % w/v Temperatura (40°C ) y NaCl (0.3 M)	CL-FL FCT: 1 Rs: 89-96 LOD: 10 ng mL <sup>-1</sup>	89
Ostol, imperatorina	Plantas medicinales	Genapol X-080/10% v/v Temperatura (60°C) y NaCl (2 M)	CL-UV Rs: 94-97 LOD: 93-124 ng mL <sup>-1</sup>	90
Xantohumol	Cerveza	Triton X-114/2.5 % v/v Temperatura (70 °C) y NaCl (15%w/v)	CL-UV FCT: 16 Rs: 90.7-101.9 LOD: 3 µg L <sup>-1</sup>	91

<sup>83</sup> C. F. Li, J.W.C. Wong, C.W. Huie, M.W.F. Choi, J. Chromatogr. A 1214 (2008) 11.

<sup>84</sup> H. Abdollahi, L. Bagheri, Anal. Chim. Acta 514 (2004) 21.1

<sup>85</sup> A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, J.D. Glennon, R. L. Deming, Anal. Bioanal. Chem 394 (2009) 1307.

<sup>86</sup> G.F. Jia, C.G. Lv, W.T. Zhu, J. Qiu, X. Wang, Z.Q. Zhou, J. Hazard. Mater. 159 (2008) 300.

<sup>87</sup> J.-B. Chen, W.-J. Zhao, W. Liu, Z.-M. Zhou, M.-M. Yang, Food Chem. 1463 (2009) 1038

<sup>88</sup> X. Liu, X.-H. Chen, Y.-Y. Zhang, W.-T. Liu, K.-S. Bi, J. Chromatogr. B 1468 (2007) 273.

<sup>89</sup> X.Y. Qina, J. Mengb, X.Y. Li, J. Zhoua, X. L. Suna, A. D. Wen, J. Chromatogr. B 872 (2008) 38-42

<sup>90</sup> J. Zhoua, X. L. Suna, S. W. Wang, J. Chromatogr. A 1200 (2008) 93.

<sup>91</sup> L. Chen, Q. Zhao, H. Jin, X. Zhang, Y. Xu, A. Yu, H. Zhang, L. Ding, Talanta 81 (2010) 692.

Colorantes tipo Sudan	Chile	Triton X-100/3% w/v Temperatura (70 °C) y Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10%, w/v)	CL-UV Rs: 81-85 LODs: 2-4 ng g <sup>-1</sup>	92
Estrógenos	Aguas residuales	Micelas acuosas de Triton X-114/ 0.25 % w/v Temperatura(45 °C) ,Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.4 M)	CL-UV FCTS:73-152 Rs: 81-99 LODs: 0.23 ng mL <sup>-1</sup>	77
Fenoles y clorofenoles	Agua de mar y residuales	Genapol X-080/3% w/v Temperatura (85 °C) y NaCl (6 %)	CL-UV FCTS: 5-10 Rs: 95.1-114.1 LODs: 1-10 µg L <sup>-1</sup>	93
Alcaloides	Tabaco	Triton X-114/5% w/v Temperatura (50 °C) y NaCl (100 µL of a saturated solution)	CG-EM Rs: 80.4 LODs: 7.1 µg g <sup>-1</sup>	94
Caseína	Leche de vaca	Triton X-114/1% w/v, NaCl (6 %)	MALDI-TOF -EM detector LODs: 5 µg mL <sup>-1</sup>	95
Residuos de filtros UV	Aguas naturales de baño	Triton X-114/0.1% (v/v) Temperatura(60°C) 0.2 M NaCl	CL-UV y CG-EM FCT: 500 Rs: ~96.5-102 LODs: 0.3-1.27 ng mL <sup>-1</sup> (CL-UV) y 2.2-30 ng L <sup>-1</sup> (CG-EM)	78
<b>SUPRAS DE MICELAS ACUOSAS DE TENSIOACTIVOS IÓNICOS</b>				
PAHs	Aguas naturales	Sodio de ácido dodecano sulfónico (SDSA)/0.1% w/v, 4 M HCl	CL-FL FCT: 140 Rs: 62-106 LODs: 0.1-7.9 ng L <sup>-1</sup>	79
	Suelo, sedimentos y lodos	Dodecano sulfonato sódico (SDoS)/ 2% w/v, 4 M HCl	CL-FL Rs:71-98 LODs: 101-456 ng L <sup>-1</sup>	96
Pesticidas	Agua potable, lago, cerveza y orina	Dodecano sulfonato sódico (SDoS)/ 0.9 % (w/v), 5.4M HCl	CL-UV FCTS: 6.9 Rs: 94-100 LOD: 4 µg L <sup>-1</sup>	97
	Agua potable, lago y nieve	Dodecil sulfato sódico (SDS)/ 2 % w/v, 5.4M HCl	Fluorimetría FCT: 3.7 Rs: 90.7-98.6 LODs: 1.90, 0.89 µg L <sup>-1</sup>	98
Tensioactivos	Lodo de	Dodecano sulfonato sódico (SDoS)/	LC-ESI(-)/EM(TI)	52

<sup>92</sup> W. Liu, W.-J. Zhao, J.-B. Chen, M.-M. Yang, Anal. Chim. Acta 605 (2007) 41.

<sup>93</sup> L. Wang, Y.-Q. Cai, B. He, C.-G. Yuan, D.-Z. Shen, J. Shao, G.-B. Jiang, Talanta 70 (2006) 47.

<sup>94</sup> J. Shen, X. Shao, Anal. Chim. Acta 561 (2006) 83.

<sup>95</sup> A. Soriano-Lopesa, J. Simone-García, R. Ramos-Catharino, L. Silva-Santos, M. Nogueira-Eberlin, M. A. Zezzi-Arruda, Anal. Chim. Acta 590 (2007) 166.

<sup>96</sup> F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 962 (2002) 1.

<sup>97</sup> G. Jia, C. Bi, Q. Wang, J. Qiu, W. Zhou, Z. Zhou, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 1423.

<sup>98</sup> G. Jia, L. Li, J. Qiu, X. Wang, W. Zhu, Y. Sun, Z. Zhou, Spectrochim. Acta Part A 67 (2007) 460.

Vitamina E	depuradora Agua	2 % w/v, 3M HCl Sodio de ácido dodecano sulfónico (SDSA)/1 % w/v, 4.2 M HCl	Rs: 91-100 LODs: 40-75 mg Kg <sup>-1</sup> CL-UV FCT: 23 Rs: 80-85	80
Fenoles y clorofenoles	Aguas Naturales	Cetrimide y 1-octanol como co-tensioactivo/0.46 % w/v y 0.06 % w/v, 4g NaCl	CL-UV FCTs: 36 Rs: 95.1-114.1 LODs: 27-62 µg L <sup>-1</sup>	80
<b>SUPRASs DE MICELAS ACUOSAS MIXTAS</b>				
PAHs	Agua de mar	POLE (0.26 % w/v) y polioxietileno-4-lauril éter (Brij 30, 0.74 % w/v), Temperatura (78 °C)	CL-FL FCT: 11.1 Rs: 72.0-98.8 LODs: 23-231 ng L <sup>-1</sup>	99
Hidrazine	Aguas potables, orina y suero humano	Triton X-114 y dodecil sulfato sódico (SDS)/ 0.2 % w/v y 0.2% w/v 5 % w/v NaCl	Detector UV Rs: 96-105 LODs: 0.08 ng mL <sup>-1</sup>	100
Antibióticos	Leche bovina	Triton X-114 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB)/ 1.5 % w/v y 0.06 w/v Temperatura (40 °C) y) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (7%)	CL-UV FCT: ~3 Rs: 78.7-98.6 LODs: 2-3 ng mL <sup>-1</sup>	101
	Medio de cultivo	N-Decyltetra óxido de etilene (C <sub>10</sub> E <sub>4</sub> ) con el co-tensioactivo colesterol-D-alanil-D-alanina Temperatura (25 °C)	CL-UV FCT: 1 Rs: 81.74	102
Ácidos húmicos y fúlvicos	Aguas Naturales	Triton X-114 y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)/ 0.2 % w/w y 0.012% w/w Temperatura (85 °C)	FIA-UV-Vis FCT: 167 R: 99.9 LOD: 5 µg L <sup>-1</sup>	103
<b>SUPRASs DE MICELAS INVERSAS</b>				
Residuos veterinarios	Pescado y marisco	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H <sub>2</sub> O/ 400 µL	CL-FL Rs: 99-102 LODs: 1.5-4.5 µg kg <sup>-1</sup> , 2-6.6 µgkg <sup>-1</sup>	58
Sudan I, II, III y IV	Salsas con chile	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H <sub>2</sub> O/ 0.5% (w/v) Water (36 mL, pH ~3)	CL-UV Rs: 86-108 LODs: 4.2, 2.7, 6.5 y 7.4 µg kg <sup>-1</sup>	104

<sup>99</sup> B. Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, Anal. Chim. Acta 518 (2004) 165.

<sup>100</sup> A. R. Zarei, Anal. Biochem. 369 (2007) 161.

<sup>101</sup> C. Kukusamude, A. Santalada, S. Boonchiangma, R. Burakham, S. Srijaranai, O. Chailapakul, Talanta 81 (2010) 486.

<sup>102</sup> C.-K. Lee, W.-D. Su, Sep. Sci. Technol. 34 (1999) 3267

<sup>103</sup> J.C.A. de Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J.A. Caruso, Analyst, 1510 (2003) 453.

<sup>104</sup> F. J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Food Chem. 121 (2010) 763.

Bisfenol A	Vegetales y frutas enlatados	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H <sub>2</sub> O / 0.5% w/v 36 mL distilled water (1.3 mM HCl)	CL-FL Rs: 81-96 LODs: 1.3 ng g <sup>-1</sup>	105
	Orina Humana	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H <sub>2</sub> O / 1% w/v Water content in diluted urine sample (~0.79 g mL <sup>-1</sup> , pH ~3)	CL-FL FCT: ~42 Rs: 88-95 LOD: 197 ng L <sup>-1</sup>	106
Ocratoxina A	Vino	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H <sub>2</sub> O / 0.5% w/v Water content in sample (~0.87 g mL <sup>-1</sup> , pH ~3-3.5)	CL-FL FCT: 115 Rs: 85-100 LODs: 4.5 ng L <sup>-1</sup> , 15 ng L <sup>-1</sup>	107
<b>VESICLE- BASED SUPRASs</b>				
Pesticidas	Agua de río o pozo	Vesículas de 1:1 ácido decanoico: decanoato/0.5 % w/v Tetrabutilamonio (TBA <sup>+</sup> )/ molar ratio C <sub>10</sub> :TBA <sup>+</sup> 2:1	CL-FL FCTs: 160-190 Rs: 75-102 LODs: 0.1–32 ng L <sup>-1</sup>	108
	Frutas	Vesículas de 1:1 ácido decanoico: decanoato/2 % w/v Tetrabutilamonio (TBA <sup>+</sup> )/ molar ratio C <sub>10</sub> :TBA <sup>+</sup> 2:1	CL-FL Rs: 93-102 LODs: 0.03-14.0 µg Kg-1	109
Bisfenol A, F y sus éteres diglicidílicos	Aguas de río y residuales	Vesículas de 1:1 ácido decanoico: decanoato/0.5 % w/v Tetrabutilamonio (TBA <sup>+</sup> )/ molar ratio C <sub>10</sub> :TBA <sup>+</sup> 2:1	CL-FL FCTs: 769 Rs: 63-74 LODs: 9-10 ng L <sup>-1</sup>	82
<p>Abreviaturas: SUPRASs, disolvente supramolecular (<i>supramolecular solvent</i>); LE, cromatografía de líquidos; FL, detección con fluorescencia; FIA, análisis por inyección en flujo (<i>flow injection analysis</i>); UV, detección ultravioleta; CG, cromatografía de gases, FPD, fotometría de llama, (<i>flame photometry detection</i>); Vis, detección en el visible; ESI(-), ionización por electrospray, modo negativo; EM, espectrometría de masas; TI, trampa iónica; APCI(+), ionización química a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>), modo positivo; MALDI, desorción/ionización con láser asistida por la matriz (<i>matrix-assisted laser desorption</i>); TOF, tiempo de vuelo (<i>time of flight</i>).</p>				

## 2.2. ADSORBENTES SUPRAMOLECULARES

Las hemimicelas y admicelas (ver figura 2.2.a) son agregados supramoleculares formados por adsorción de un tensioactivo iónico a un

<sup>105</sup> A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 617 (2008) 51.

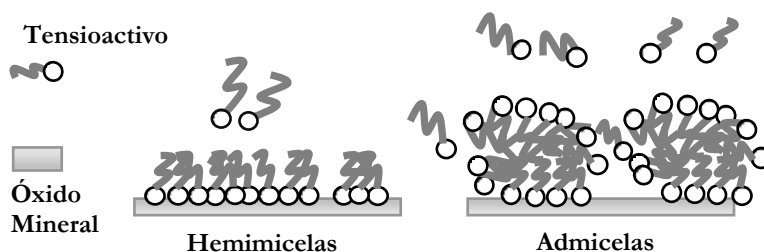
<sup>106</sup> A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Food Addit. Contam., Part A, 26 (2009) 265

<sup>107</sup> S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 617 (2008) 3

<sup>108</sup> A.Moral, M.D. Sicilia, S.Rubio, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 3740.

<sup>109</sup> A.Moral, M.D. Sicilia, S.Rubio, Anal. Chim. Acta 650 (2009) 207.

óxido mineral de carga opuesta. Los óxidos minerales tradicionalmente usados han sido alúmina y sílice<sup>110</sup>, aunque en la actualidad han cobrado especial relevancia los soportes constituidos por nanopartículas de magnetita<sup>111,112</sup>, magnetita recubierta por sílice<sup>113</sup> o alúmina<sup>114</sup> y nanotubos de titanato<sup>115</sup>, así como otros materiales como las resinas de intercambio iónico<sup>116,117</sup>.



**Figura 2.2.a. Representación simplificada de hemimicelas y admicelas de tensioactivos**

### ***2.2.1. Formación del adsorbente supramolecular: Isotermas de adsorción***

El tipo de agregado formado sobre la superficie del óxido mineral depende de una serie de factores, entre los que cabe destacar el sistema tensioactivo-soporte sólido usado, el pH al que se produce la adsorción del tensioactivo sobre el soporte y la relación cantidad de tensioactivo/cantidad de soporte sólido utilizada en la producción del adsorbente. Para establecer el tipo o tipos de agregados formados en unas condiciones experimentales

<sup>110</sup> S. Gangula, S. Suen, E. D. Conte, *Microchem. J.* 95 (2010) 2.

<sup>111</sup> J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1180(2008) 24

<sup>112</sup> X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1201

<sup>113</sup> X. Zhao, Y. Shi, T. Wang, Y. Cai, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 140.

<sup>114</sup> L. Sun, C. Zhang, L. Chen, J. Liu, H. Jin, H. Xu, L. Ding, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 162.

<sup>115</sup> H. Niu, Y. Cai, Y. Shi, F. Wei, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 113.

<sup>116</sup> J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.

<sup>117</sup> K.R. Reid, L.J. Kennedy, E. W. Crick, E. D. Conte, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 135.

dadas es fundamental conocer la isoterma de adsorción del tensioactivo sobre el soporte en dichas condiciones experimentales.

La adsorción del tensioactivo iónico sobre la superficie del sólido puede tener lugar a través de dos tipos de interacciones, fisiadsorción y quimiadsorción. La fisiadsorción es el proceso más común y se ha observado en alquilsulfatos, sulfonatos, aminas y alquilarilsulfonatos en las interfases agua-alúmina, agua-sílice, agua-magnetita, etc. La fisiadsorción tiene dos componentes, la primera tiene lugar a bajas concentraciones de tensioactivo y ocurre como un simple intercambio iónico en la doble capa eléctrica, la segunda es hidrófoba y más específica y ocurre a mayores concentraciones de tensioactivo y conlleva una disminución de la energía libre del sistema por agregación de las cadenas alquílicas en la interfase. La energía libre de adsorción en estas condiciones viene dada por la fórmula:

$$\Delta G^0_{\text{ads}} = \Delta G^0_{\text{elect}} + \Delta G^0_{\text{CH}_2} = z \pm e\psi_\delta + n\phi_{\text{CH}_2}^{118}$$

La componente  $\Delta G^0_{\text{elect}}$  se corresponde con la interacción electrostática de un ión de carga  $z$  que se absorbe en un plano  $e$  y cuyo potencial es  $\psi_\delta$ , mientras que la componente  $\Delta G^0_{\text{CH}_2}$  es la contribución hidrófoba del total del grupo  $\text{CH}_2$  de la cadena al interactuar entre ellos en la interfase.

La quimiadsorción de tensioactivos sobre óxidos minerales ocurre en menor medida que la fisiadsorción y conlleva la formación de enlaces covalentes fuertes. Este es el caso del grupo carboxilato sobre óxidos de hierro (II,III) o (III), magnetita o maghemita, respectivamente, reacción que ocurre con facilidad a altas temperaturas ( $>70$  °C)<sup>119,120</sup>. En este caso una nueva componente ( $\Delta G^0_{\text{qui}}$ ) intervendría en el proceso de adsorción y sería incluida en la fórmula anterior.

En la Figura 2.2. se muestra una isoterma de adsorción y las estructuras de los agregados de tensioactivo formados en las distintas regiones de la

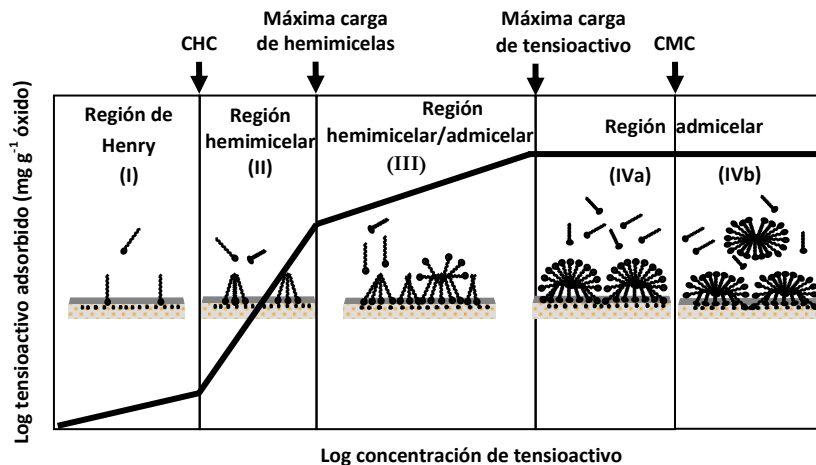
<sup>118</sup> D.W. Fuerstenau, J. Phys. Chem. 60 (1956) 981.

<sup>119</sup> Avdeev, M. V.; Bica, D.; Veka's, L.; Marinica, O.; Balasoiu, M.; Aksenov, V. L.; Rosta, L.; Garamus, V. M.; Schreyer, A. J. J. Magn. Magn. Mater. 311 (2007) 6.

<sup>120</sup> Wang, X.; Zhang, C.; Wang, X.; Gu, H. Appl. Surf. Sci. 253 (2007) 7516.

misma. La región correspondiente a concentraciones de tensioactivo inferiores a la concentración hemimicelar crítica (CHC) se denomina región de Henry (región I). En ella, los grupos cabeza de los monómeros de tensioactivo interactúan electrostáticamente con la superficie del óxido mineral, sin que se produzca ningún tipo de interacción entre los monómeros adsorbidos. A concentraciones de tensioactivo superiores a su CHC, región hemimicelar (región II), además de interacciones electrostáticas del tensioactivo con la superficie del óxido, se producen interacciones hidrofóbicas entre sus cadenas hidrocarbonadas, formándose una monocapa constituida por estructuras de agregación típicas, denominadas *tepee*. Cuando toda la superficie del óxido está neutralizada y la densidad de hemimicelas es máxima, comienzan a formarse admicelas (región III), que son agregados con una estructura similar a la de las micelas. En esta región, la adsorción del tensioactivo se produce exclusivamente mediante interacciones hidrófobas entre las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo. Una vez alcanzada la carga máxima del tensioactivo, toda la superficie del óxido está cubierta por admicelas, y la adición de más tensioactivo produce un incremento de la concentración de monómero en disolución (IVa), hasta alcanzar la concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual se forman micelas acuosas (IVb).

Las variables que más influyen en la formación de los agregados supramoleculares sobre superficies de óxidos minerales son el pH, la concentración de electrolito, la estructura del tensioactivo, la presencia de aditivos orgánicos y la temperatura.



**Figura 2.2.b Estructuras de los agregados de tensioactivo formados en cada una de sus cuatro regiones**

El pH determina la carga superficial del óxido y por tanto la extensión de la fisiadsorción del tensioactivo sobre el mismo. La superficie del óxido mineral es positiva o negativa a valores de pH mayores o menores que su punto de carga cero (*point of zero charge, pzc*). El pH también afecta a la concentración de tensioactivo a la que se forman hemimicelas y admicelas<sup>121</sup>. La alúmina ( $pzc=8,5$ ) generalmente se utiliza para la formación de adsorbentes supramoleculares de tensioactivos aniónicos a valores de pH ácidos y la sílice ( $pzc=3$ ) para la formación de adsorbentes supramoleculares de tensioactivos catiónicos a valores de pH cercanos a la neutralidad<sup>122</sup>. La influencia del pH en la carga de tensioactivo obtenida es muy importante, así por ejemplo las cargas máximas de SDS por gramo de alúmina en las regiones hemimicelar y admicelar son de 80 mg y 180 mg a pH 2 y disminuyen a valores de 20 mg y 30 mg a pH 6.

<sup>121</sup> F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 76 (2004) 3878.

<sup>122</sup> L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Analyst 131 (2006) 835.



La influencia de la fuerza iónica en la formación de agregados supramoleculares sobre óxidos minerales depende del tipo de agregado formado. La adición de sal provoca una reducción de las fuerzas atractivas tensioactivo-óxido mineral y de las repulsivas electrostáticas entre los grupos cargados del tensioactivo y, como consecuencia, se favorece la formación de admicelas y se desfavorece la de hemimicelas<sup>123</sup>.

Otras variables a tener en cuenta son la longitud y el número de cadenas laterales de la región hidrófoba del tensioactivo y la presencia de aditivos orgánicos, que influyen en la formación de hemimicelas y admicelas de igual modo que influyen en la CMC de las micelas acuosas. Así, se observa una variación en las interfases entre la región II y la región III (CHC) y región III y IV en la misma dirección en la que se afecta la CMC (Figura 2.2.). Por ejemplo la CMC y CHC disminuyen por un factor de aproximadamente 3 al incrementarse en una unidad el número de átomos de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo (regla de Traube)<sup>124</sup>.

La temperatura aumenta la energía cinética de los monómeros de tensioactivo y por tanto la entropía del sistema, lo cual resulta en una disminución de la carga de tensioactivo sobre el sólido. Por esta razón los adsorbentes supramoleculares basados exclusivamente en procesos de fisiadsorción se forman a temperatura ambiente<sup>125</sup>.

### ***2.2.2. Características de los adsorbentes supramoleculares como extractantes***

El proceso a través del cual los analitos se reparten entre la disolución en equilibrio y el adsorbente de hemimicelas/admicelas recibe el nombre de adsolubilización. Los adsorbentes supramoleculares son muy versátiles para su uso en extracción en fase sólida. La adsolubilización de compuestos orgánicos se puede producir mediante diferentes mecanismos de interacción tensioactivo-analito dependiendo del tipo de adsorbente supramolecular

---

<sup>123</sup> A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Bional. Chem* 388 (2007) 1823.

<sup>124</sup> A. Fan, P. Somasundaran, N. J. Turro, *Langmuir* 13 (1997) 506.

<sup>125</sup> S. Paria, K. C. Khilar, *Adv. Colloid Interfac.* 110 (2004) 75.

usado (hemimicelas, hemimicelas/admicelas o admicelas), de la estructura molecular del tensioactivo utilizado para formar el adsorbente y de la estructura molecular del propio analito. La superficie exterior de hemimicelas y admicelas es hidrofóbica e iónica respectivamente, proporcionando diferentes mecanismos de extracción para compuestos orgánicos. Además, los grupos polares pueden ofrecer otro tipo de interacciones diferentes a las electrostáticas, como por ejemplo, la formación de puentes de hidrógeno, cuando se utilizan tensioactivos con grupos aceptores o donadores de protones (por ej. alquilcarboxilatos), o interacciones  $\pi$ -catión, usando tensioactivos catiónicos para retener analitos con anillos aromáticos en su estructura molecular. Por otro lado, existe un gran número de tensioactivos comercialmente disponibles, de modo que el grado de hidrofobicidad y el grupo polar pueden seleccionarse en función del analito a extraer.

Las regiones de adsorción adecuadas para SPE son aquellas en las que coexisten agregados sobre el sólido y monómeros en disolución. Por el contrario la región de Henry (región I), donde los agregados aún no se forman y la región IV, donde los solutos se distribuyen entre admicelas y micelas, no son adecuadas para SPE.

La adsolubilización de compuestos anfífilicos mediante la formación de hemimicelas/admicelas mixtas es de especial interés en extracciones analíticas por su elevada eficacia. Aunque la adsorción directa de tensioactivos no iónicos sobre la superficie de óxidos minerales es muy baja, esta se incrementa de forma significativa en presencia de tensioactivos iónicos mediante la formación de agregados mixtos<sup>96,126,127</sup>. La eficacia de adsolubilización de los tensioactivos no iónicos mediante formación de hemimicelas/admicelas mixtas depende de la naturaleza y estructura química de los tensioactivos. La eficacia de la adsolubilización de tensioactivos no iónicos es mayor en presencia de agregados aniónicos que catiónicos<sup>99</sup> y la de tensioactivos iónicos, aumenta cuando ambos tensioactivos tienen carga

---

<sup>126</sup> E. Fu, P. Somasundaran, Q. Xu, en: P. M. Holland, D.N. Rubingh (Ed.), *Mixed Surfactant Systems*. ACS Symposium Series 501. American Chemical Society, Washington, DC, 1992, Cap. 25.

<sup>127</sup> P. Somasundaran, L. Huang, *Advances in Colloid and Interface Science* 88 (2000) 179.

opuesta<sup>128</sup>. En general, la eficacia de adsolubilización aumenta al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del analito y del tensioactivo.

La variedad de interacciones que ofrecen estos adsorbentes permiten una elevada adsolubilización de analitos y por tanto volúmenes de ruptura altos (250-1000 mL). A diferencia de lo que ocurre con adsorbentes convencionales, que retienen fuertemente al analito (p. ej. resinas poliméricas con un grado de entrecruzamiento alto), los volúmenes de desorción requeridos son bajos y del orden de 1-2 mL. De este modo se pueden alcanzar factores de concentración elevados sin necesidad de evaporar los extractos. La elución se lleva a cabo con disolventes orgánicos como metanol, acetonitrilo o 2-propanol o mediante disoluciones hidroorgánicas que causen la ruptura de los agregados por un cambio de pH. Para adsorbentes de hemimicelas/admicelas sobre resinas o membranas de intercambio iónico se suelen usar mezclas de disoluciones salinas y disolventes orgánicos.

### **2.2.3. Formatos de extracción**

Los adsorbentes supramoleculares se usan preferencialmente en forma de cartuchos y se forman a través de procesos de fisiadsorción. Este procedimiento conlleva al menos tres etapas:

1. *Formación del adsorbente supramolecular.* La disolución de tensioactivo, con un pH igual al que se usará para realizar la extracción de los analitos, se pasa a través del soporte sólido empaquetado en un cartucho de extracción.
2. *Adsolubilización de los analitos.* La muestra se hace pasar a través del adsorbente a una velocidad de percolación adecuada para asegurar una adsolubilización eficaz de los analitos.
3. *Elución de los analitos.* Los analitos se eluyen con un pequeño volumen (1-2 mL) de disolvente orgánico o disolución acuosa a un valor de pH adecuado para la desorción del tensioactivo.

---

<sup>128</sup> X. Zhao, J. Li, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, J. Chromatogr. A 1154 (2007) 52.



**Figura 2.2.c Procedimiento operativo para la extracción de analitos en muestras acuosas con el uso de adsorbentes supramoleculares**

Para garantizar que la carga de tensioactivo sobre el óxido mineral se mantenga constante durante la extracción, el pH de la muestra debe ajustarse al valor al que se han formado los agregados. Por otro lado, debido a que las hemimicelas y admicelas se encuentran en equilibrio con los monómeros de tensioactivo en disolución, la continua distribución del tensioactivo adsorbido a la fase acuosa durante la percolación de la muestra puede originar la pérdida de parte del tensioactivo, lo que resulta en la modificación de la constante de distribución de los analitos. Cuando se trabaja en la región hemimicelar, las pérdidas de tensioactivo no son significativas, ya que la concentración de monómeros en la disolución es muy baja (del orden de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). De igual modo ocurriría en el caso menos común de trabajar con un adsorbente hemimicelar generado por quimiadsorción, para el cual no es necesario mantener una concentración de monómeros en equilibrio debido a la naturaleza del enlace covalente. Sin embargo, en la región hemimicelar/admicelar y la región admicelar, la concentración de monómero en la disolución de equilibrio es del orden de  $\text{mg L}^{-1}$  y, por tanto, es necesaria la adición de tensioactivo a la muestra para mantener esta concentración y evitar cambios en la carga de tensioactivo del adsorbente durante la percolación de la muestra.

El acoplamiento *on-line* del adsorbente hemimicelar o admicelar a CL puede llevarse a cabo de forma simple, usando una columna de Teflón empaquetada con el óxido mineral. En este caso, el SPE consta de cinco etapas: carga del óxido con el tensioactivo, retención de los analitos, elución de los analitos con un pequeño volumen de disolvente orgánico (p. ej. 200  $\mu$ L), eliminación completa de la carga de tensioactivo con un mayor volumen de disolvente ( $\sim$  1mL) y recuperación de la carga inicial pasando una disolución de tensioactivo al pH adecuado. Usando esta estrategia se han alcanzado factores de concentración de hasta 250 veces para herbicidas con grupos amonio cuaternarios empleando SDS sobre alúmina como adsorbente admicelar <sup>121</sup>.

Recientemente se han propuesto otro tipo de formatos de extracción, concretamente los basados en membranas de intercambio iónico y materiales magnéticos como soportes para la adsorción del tensioactivo. La formación de agregados sobre la membrana se lleva a cabo incubando la misma en una disolución hidroetanólica durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana con los agregados de tensioactivo inmovilizados se coloca en un soporte y la muestra se hace pasar través de ella mediante una bomba peristáltica. Esta metodología se ha propuesto para la extracción de verde de malaquita, violeta de metilo 2B y doxepina utilizando ácidos carboxílicos ( $C_7$ - $C_{17}$ )<sup>129</sup> como tensioactivos. La principal desventaja de esta estrategia son los bajos valores de enriquecimiento obtenidos ( $\leq 2$ ).

La extracción con adsorbentes de hemimicelas/admicelas soportados sobre materiales magnéticos (normalmente magnetita,  $Fe_3O_4$ ) sin y con recubrimiento de sílice o alúmina, se realiza dispersando las nanopartículas con la muestra acuosa mediante agitación mecánica o ultrasonidos<sup>113,130,131</sup>. A continuación las nanopartículas magnéticas se retiran de la disolución con un imán y los analitos se desorben mediante el uso de disolvente orgánico. La mayor área superficial de las nanopartículas permite una mayor carga de

---

<sup>129</sup> S.-M. Hong, S.-J. Chen, H.-C. Chiu, D. Sulejmanovic, E.D. Conte, S.-Y. Suen, *Microchem. J.* 90 (2008) 129.

<sup>130</sup> J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr., A* 1180 (2008) 24.

<sup>131</sup> L. Sun, C. Zhang, L. Chen, J. Liu, H. Jin, H. Xu, L. Ding, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 162.

tensioactivo y sus propiedades magnéticas permiten llevar a cabo un SPE disperso, que es mucho más rápido y simple que el formato tradicional en cartucho.

#### **2.2.4. Compatibilidad con técnicas de separación y detección**

La determinación de los analitos, tras su extracción con adsorbentes de hemimicelas/admicelas, se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos acoplada a UV, FI o EM. Los extractos contienen una elevada cantidad de tensioactivo, como resultado de la ruptura de los agregados fisiadsorbidos en la etapa de elución. Por esta razón, los tensioactivos con bajos tiempos de retención en cromatografía y/o que no contengan grupos aromáticos en su estructura que puedan dar señal en UV o FL son los preferidos (p. ej. SDS o CTABr). Al igual que ocurre con los SUPRASs, cuando se emplea EM como sistema de detección el tensioactivo se envía a desecho después del desarrollo cromatográfico para evitar el ensuciamiento de la fuente de ionización.

La combinación de hemimicelas y admicelas con GC y EC apenas ha encontrado aplicación debido a la elevada concentración del tensioactivo en el extracto. Se han descrito no obstante algunas estrategias como la re-extracción de los analitos en un disolvente apolar (p. ej. isoootano) en el que el tensioactivo iónico es insoluble antes de la inyección en CG-EM<sup>132</sup>.

#### **2.2.5. Aplicaciones analíticas**

Dada la capacidad de los adsorbentes supramoleculares para adsolubilizar analitos mediante diferentes tipos de interacciones y los elevados factores de preconcentración que proporcionan, estos adsorbentes constituyen una excelente herramienta para la extracción de compuestos de muy diferente naturaleza a baja concentración en muestras acuosas medioambientales.

Inicialmente, la extracción en fase sólida supramolecular se utilizó para la extracción de metales pesados basada en la formación de complejos, usando

---

<sup>132</sup> Q. Zhao, J. Simmons, E.D. Conte, J. Chromatogr., A 1132 (2006) 1.

ligandos previamente adsolubilizados sobre el adsorbente o adsolubilizando los complejos formados en la disolución acuosa<sup>133,134,135</sup>. Actualmente, su uso se ha extendido a la extracción/preconcentración de compuestos orgánicos<sup>111</sup>. En la Tabla 2.2.a se muestran los diferentes adsorbentes supramoleculares usados para la extracción de compuestos orgánicos en muestras acuosas medioambientales.

Los adsorbentes supramoleculares obtenidos mediante la adsorción de SDS sobre alúmina han sido los más utilizados en extracciones analíticas. En la mayoría de los casos, la adsolubilización se produce mediante interacciones hidrófobas con las hemimicelas de SDS y así se ha aplicado con éxito a la extracción de ftalatos<sup>136</sup> y estrógenos<sup>137</sup>. Los adsorbentes de hemimicelas/admicelas<sup>138</sup> y admicelas<sup>123</sup> proporcionan buenos rendimientos de extracción para compuestos catiónicos y polares, gracias a las interacciones con los grupo sulfato en la superficie de las admicelas. La incorporación del catión tetrabutilamonio ( $\text{Bu}_4\text{N}^+$ ) al sistema SDS-alúmina, para formar agregados mixtos  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ -SDS-alúmina, aumenta la capacidad del adsorbente para solubilizar analitos polares con anillos aromáticos en su estructura a través de interacciones  $\pi$ -catión, además de las hidrofóbicas<sup>139</sup>. Este adsorbente mixto se ha usado para la extracción multiresiduo de plaguicidas ácidos, neutros y básicos en aguas naturales, alcanzándose factores de preconcentración que variaron entre 60 y 250<sup>140</sup>.

La capacidad de los adsorbentes supramoleculares para adsolubilizar compuestos anfífilicos mediante la formación de agregados mixtos se ha utilizado para extraer tensioactivos no iónicos<sup>141</sup>, aniónicos<sup>122</sup> y catiónicos<sup>116,142</sup>, compuestos perfluorados<sup>130</sup> y drogas (ibuprofeno y

---

<sup>133</sup> J. L. Manzoori, M. H. Sorouraddin, F. Shemirani, *Talanta* 42 (1995) 1151.

<sup>134</sup> M. Hirade, J. Iwasawa, H. Tawaguchi, *Talanta* 44 (1997) 231.

<sup>135</sup> M. Hirade, Hori, *J. Anal. Sci.* 15 (1999) 1055.

<sup>136</sup> J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 142.

<sup>137</sup> A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 407.

<sup>138</sup> A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 132.

<sup>139</sup> A. Moral, M. D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1100 (2005) 8.

<sup>140</sup> A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61.

<sup>141</sup> M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 161.

<sup>142</sup> F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.

naproxeno)<sup>143</sup>. Las fuertes interacciones que se establecen entre las moléculas del tensioactivo que forman el adsorbente y el analito anfifílico permiten obtener extracciones cuantitativas usando volúmenes de muestra muy elevados (0,5-1 L). Los adsorbentes de hemimicelas/admicelas aniónicas proporcionan una elevada eficacia para la adsolubilización de compuestos anfifílicos no iónicos y catiónicos y las hemimicelas/admicelas catiónicas para la adsolubilización de compuestos anfifílicos aniónicos.

**Tabla 2.2.a. Aplicaciones de adsorbentes supramoleculares a la extracción de compuestos orgánicos en procesos analíticos**

Adsorbente Supramolecular	Analito	Muestra	Separación-detección /Factor de concentración teórico (FCT), recuperaciones (Rs, %) y límites de detección (LODs)	
<b>ADSORBENTES DE HEMIMICELAS Y/O ADMICELAS DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS</b>				
<b>SDS-ALÚMINA</b>	Tensioactivos no iónicos	Aguas residuales y de río	CL-APCI(+)/EM(IT) FCTs: 250-750 Rs: 91-98% LODs: 10-111 ng L <sup>-1</sup> (agua residual), 4-35 ng L <sup>-1</sup> (agua de río).	141
	Tensioactivos catiónicos	Aguas residuales y de río	CL-ESI (+)/EM(IT) FCTs: 250-1000 Rs: >70% LODs: 4 ng L <sup>-1</sup>	142
	Alquilfenoles y alquilfenol-carboxilatos	Agua de río	CL-ESI (-)/EM(IT) FCTs: 500 Rs: 87-100 LODs: 75-193 ng L <sup>-1</sup>	144
	Clorofenoles	Aguas residuales	CL-UV FCTs: 200 Rs: >90 para tetra- y pentaclorofenol LODs: nivel de µg L <sup>-1</sup>	145
	Ésteres de ftalato	Aguas residuales y de río	CL-APCI(+)/EM(IT) FCTs: 2500 Rs: 88-103% LODs: 0.07-0.16 µg L <sup>-1</sup>	136

<sup>143</sup> E. M. Costi, I. Goryacheva, M. D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1210 (2008) 1.

<sup>144</sup> M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 271.

<sup>145</sup> T. Saitoh, Y. Nakayama, M. T. Hiraide, D. Bitting, J. H. Harwell, J. Chromatogr. A 972 (2002) 205



	Fungicidas	Aguas de río y pozo	CL-FL FCTs: 400-1000 Rs: 96-108 LODs: 0.07-23 ng L <sup>-1</sup>	138
	Herbicidas	Agua potable y embotellada	CL-ESI (+)/EM(IT) FCTs: 200 Rs:>70 LODs: 10-30 ng L <sup>-1</sup>	119
<b>SDS-ALÚMINA</b>	Ibuprofeno y naproxeno	Aguas residuales	CL-FL FCTs: 375-500 Rs: 93-101 LODs: 0.5-9 ng L <sup>-1</sup>	143
<b>SDS-RESINA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO</b>	Tensioactivos catiónicos	Agua de río	CL-UV FCTs:500 LODs: 2.3-3.6 µg L <sup>-1</sup>	114
<b>ADSORBENTES DE HEMIMICELAS Y/O ADMICELAS DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS</b>				
<b>TBAC-ALÚMINA</b>	Bisfenoles	Aguas residuales	CL-FL FCTs: 400 Rs: 96-106 LODs: 10-15 ng L <sup>-1</sup>	139
<b>AEROSOL OT-ALÚMINA</b>	Clorofenoles, fenoles y dibutilftalato	Agua de río	CL-UV FCTs: 500 Rs: >70 LODs: nivel de nM	146
<b>CTAB-SÍLICE</b>	Compuestos perfluorados	Agua de río	CL-ESI (-)/EM <sup>2</sup> (QQQ) FCTs: 500 Rs: 59-960 LODs: 0.05-0.28 ng L <sup>-1</sup>	126
<b>DDAB-SÍLICE</b>	PAHs	Aguas de grifo y río	CL-FL y CG-EM FCTs: 250 (CL-FL) y 167 (CG-EM) Rs: 29-110 (dependientes de la concentración) LODs: 0.31-78.9 ng L <sup>-1</sup> (CL-EM), 18.4-238 ng L <sup>-1</sup> (CG-EM)	132
<b>CTAB-MAGNETITA</b>	Clorofenoles	Agua potable, subterránea, de río y residual	CL-UV FCTs: 700 Rs: 83-98 LODs: 0.11 and 0.15 µg L <sup>-1</sup>	130
<b>CPC-MAGNETITA RECUBIERTA DE SÍLICE</b>	Bisfenol A, 4- <i>tert</i> -octilfenol y 4- <i>n</i> -nonylphenol	Agua potable, subterránea, de río y residual	CL-FL FCTs: 1600 Rs: 66-106 LODs:7-20 ng L <sup>-1</sup>	111

<sup>146</sup> T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 185.

<b>CTAB-NANOTUBOS DE TITANATO</b>	Ésteres de ftalato	Aguas naturales de río y pozo	CL-FL FCTs: 1000 Rs: 40-100 LODs: 19-39 ng L <sup>-1</sup>	113
<b>ADSORBENTES MIXTOS DE HEMIMICELAS Y/O ADMICELAS DE VARIOS TENSOACTIVOS</b>				
<b>CTAB-CPC-SÍLICE</b>	Tensioactivos aniónicos	Aguas residuales y de río	CL-ESI (+)/EM(IT) FCTs: 10-25 Rs: 86-110 LODs: 4 ng L	121
<b>SDS-TBABr-ALÚMINA</b>	Multiresiduos de plaguicidas	Aguas de río y pozo	CL-UV FCTs: 125-250 Rs: ~20-100 LODs: <100 ng L	140
<p>Abreviaturas: SDS, dodecilsulfato sódico; LE, cromatografía de líquidos; APCI(+), ionización química a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>), modo positivo; EM, espectrometría de masas; TI, trampa iónica; ESI(-), ionización por electrospray, modo negativo; ESI(+), ionización por electrospray, modo positivo; UV, detección ultravioleta; FL, detección con fluorescencia; TBAC, cloruro de tetrabutilamonio; Aerosol OT, [bis-(2-etilhexil)] sulfosuccinato de sodio; CTAB, bromuro de cetiltrimetilamonio; DDAB, bromuro de dicetildimetilamonio; CG, cromatografía de gases; CPC, cloruro de cetilpiridinio; TBABr, bromuro de tetrabutilamonio.</p>				





# BLOQUE I

*Metodologías rápidas para el análisis de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales y de alimentos*



## 1. OBJETO

---

Las medidas de control o monitorización de la contaminación química son cada vez más exigentes y su cumplimiento plantea nuevos retos en el ámbito de la química analítica. Así, los esfuerzos para mejorar las metodologías de análisis de contaminantes, tanto ambientales como agroalimentarios, están orientados a la mejora de la calidad analítica de los resultados, la disminución de los límites de cuantificación y el aumento del número de muestras que pueden procesarse y, por otro lado, a la adecuación a los principios de la *química verde*, para reducir al máximo la contaminación generada durante el análisis.

La simplificación del proceso de extracción y limpieza de muestras es un objetivo prioritario en el ámbito de la investigación en análisis químico. Con este fin se han desarrollado una variedad de estrategias más simples o miniaturizadas que proponen un menor consumo de disolventes orgánicos tóxicos y ofrecen mayor eficacia.

Respecto a las técnicas de extracción con disolventes se han desarrollado nuevos formatos miniaturizados como la *extracción en una gota*. También se han propuesto técnicas con aporte de energía externa para mejorar la eficacia de extracción (*extracción con líquidos presurizados* o *extracción asistida por microondas*) y se ha prestado especial atención el uso de disolventes alternativos, como *fluidos supercríticos* o más recientemente *líquidos iónicos*. En este sentido, los disolventes supramoleculares ofrecen una alternativa adecuada para proporcionar métodos simples y rápidos y de menor consumo en disolvente orgánico.

Las investigaciones que se presentan en este primer bloque de la Tesis Doctoral han tenido como objetivo último el desarrollo de metodologías rápidas para la extracción y determinación de contaminantes prioritarios o emergentes en distintos compartimentos ambientales o alimentos, que permitan el cumplimiento de la legislación pertinente y ofrezcan una alternativa adecuada a las metodologías existentes en cuanto a simplicidad,

rendimientos de extracción y sensibilidad. Las metodologías propuestas para alcanzar este objetivo se han basado en la microextracción líquido-líquido de los analitos con un disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácidos carboxílicos en mezclas THF:agua para el caso de alteradores endocrinos (bisfenol A, F y sus éteres diglicídicos), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y ocratoxina A. Para el caso especial de compuestos perfluorados (ácidos y sulfonatos de 6 a 14 átomos de carbono), la mezcla THF:agua proporcionó por sí sola elevados rendimientos de extracción dada la capacidad de estos compuestos de autoasociarse en esta mezcla hidroorgánica.

Un segundo objetivo de este primer bloque ha sido profundizar en las propiedades y comportamiento de los disolventes supramoleculares de micelas inversas de ácidos carboxílicos. Así, se proponen ecuaciones predictivas en cuanto al volumen generado de disolvente en función de la cantidad o concentración de cada uno de los componentes, se estudian los diagramas de fases y cómo se modifican en función de los componentes mayoritarios de la matriz de la muestra y se determina la capacidad del disolvente para la estabilización de PAHs.

A continuación se describe brevemente el marco legislativo de los contaminantes estudiados, los aspectos y propiedades más importantes de los disolventes supramoleculares empleados y los resultados obtenidos en este primer bloque de la Tesis Doctoral.

## **2. MARCO LEGISLATIVO DE LA CONTAMINACIÓN QUÍMICA AMBIENTAL Y ALIMENTARIA**

---

El desarrollo tecnológico e industrial ha provocado un grave deterioro del medioambiente y ha generado importantes fuentes de contaminación en el sector agroalimentario. Durante las últimas décadas se han implementado una amplia variedad de instrumentos políticos y normativos para el control y prevención de la contaminación. La necesidad de conseguir un

medioambiente sano para asegurar la salud pública y la calidad de vida, se ve reflejada en la adopción de medidas de reducción y monitorización de la contaminación química cada vez más estrictas por parte de las autoridades nacionales y europeas.

La contaminación química del agua constituye una grave amenaza para el



medioambiente acuático y conlleva efectos en los organismos que lo habitan tales como toxicidad aguda o crónica, bioacumulación y pérdida de hábitats y biodiversidad, así como efectos negativos en la salud humana.

La directiva marco del agua (Directiva 2000/60/EC)<sup>147</sup>, recientemente reformada

(Directiva 2008/105/EC)<sup>148</sup>, establece un marco de actuación comunitario para la protección de las aguas naturales continentales y costeras. En cuanto al control de la contaminación química, la Directiva establece una lista de 33 sustancias (o grupos de sustancias) prioritarias y/o peligrosas (anexo II). Entre estos contaminantes se encuentran pesticidas, retardantes de llama bromados, cloroalcanos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y metales. La monitorización del nivel de contaminación de estas sustancias se establece en base a unos niveles de concentración máximos permitidos (media anual y concentración máxima admisible) denominados como normas de calidad ambiental (NCA). La nueva Directiva incluye también un anexo III de sustancias sujetas a revisión para su inclusión en la lista de contaminantes prioritarios. En este anexo se encuentran contaminantes emergentes como bisfenol A (BPA), perfluorooctanosulfonato (PFOS) y pesticidas como glifosato o mecoprop, para los que la comunidad científica está desarrollando

<sup>147</sup> Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. DO L 327 de 22.12.2000, p.1

<sup>148</sup> Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativas a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/ CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. DO L 348 de 24.12.2008, p. 84



extensos estudios con el objeto de determinar su presencia en los distintos compartimentos ambientales, así como sus efectos ecotoxicológicos<sup>149,150</sup>.

Los instrumentos de control de la contaminación química se han extendido también al ámbito agroalimentario. Aunque los rápidos avances en las técnicas de procesamiento y envasado de los alimentos ayudan a garantizar un abastecimiento de alimentos seguro y sano, siguen existiendo riesgos de contaminación alimentaria y los avances han generado nuevas fuentes de contaminación. Así, la contaminación de los alimentos puede tener un origen ambiental u ocurrir durante las diferentes etapas de la producción, envasado, transporte o almacenamiento. Dentro del ámbito de la seguridad alimentaria química y en la categoría contaminantes, la UE ha tomado medidas de control estrictas sobre determinados compuestos o grupos de compuestos, concretamente micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, patulina, deoxinivalenol, zearalenona, toxinas T-2 y HT-2), metales (Cd, Pb, Hg y Sn inorgánico), dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs), PAHs, 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) y nitratos, según el Reglamento No 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios<sup>151</sup> (posteriormente modificado por los reglamentos 199/2006, 1881/2006, 1126/2007, 565/2008, 629/2008, 105/2010 y 165/2010). Asimismo la comunidad europea investiga una serie de contaminantes emergentes y ha establecido recomendaciones para su vigilancia en alimentos por parte de los estados miembro. Entre estos contaminantes emergentes se encuentran acrilamida<sup>152</sup>, furano<sup>153</sup>, compuestos orgánicos de estaño<sup>154</sup>, carbamato de etilo<sup>155</sup> y

---

<sup>149</sup> Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts, The EFSA Journal (2008) 653, 1-131.

<sup>150</sup> Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. The EFSA Journal (2010); 8(9):1829.

<sup>151</sup> Reglamento (CE) n o 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 364 de 20.12.2006, p. 5

<sup>152</sup> Recomendación de la Comisión de 2 de junio de 2010 relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos. DO L 137 de 3.6.2010, p. 4.

<sup>153</sup> Recomendación de la Comisión de 28 de marzo de 2007 relativa al seguimiento de la presencia de furano en productos alimenticios. DO L 88 de 29.3.2007, p. 56

compuestos perfluorados<sup>156</sup>. Para facilitar la labor de vigilancia sobre las incidencias de contaminación alimentaria entre países miembro, la UE ha establecido un sistema de notificación de alarmas conocido como *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*. Además, dentro del marco de la seguridad alimentaria química existe una amplia legislación europea concerniente a otras categorías distintas a contaminantes, tales como aditivos (conservantes, colorantes o potenciadores del sabor), residuos veterinarios, residuos de pesticidas, hormonas en carnes y límites máximos de migración para materiales en contacto con alimentos o aguas potables<sup>157</sup>.

### **3. DISOLVENTE SUPRAMOLECULAR DE MICELAS INVERSAS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS**

---

#### **3.1. Formación del disolvente**

El disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácidos carboxílicos en mezclas de tetrahidrofurano (THF) y agua fue descrito por nuestro grupo de investigación y presenta un gran potencial para la extracción de contaminantes en muestras ambientales<sup>158</sup>.

La coacervación de ácidos carboxílicos saturados ( $C_8$ - $C_{16}$ ) e insaturados ( $C_{18}$ ) ocurre en una amplia variedad de disolventes orgánicos próticos (etilenglicol, metanol, etanol, 1-propanol) y apróticos (tetrahidrofurano, N-N-dimetilformamida, acetonitrilo, acetona y dioxano) en presencia de agua, que es un mal disolvente para los mismos. Para que la coacervación se produzca, el disolvente orgánico y el agua deben ser miscibles.

---

<sup>154</sup> Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotin in foodstuffs. The EFSA Journal (2004) 102, 1-119.

<sup>155</sup> Recomendación de la Comisión, de 2 de marzo de 2010, relativa a la prevención y la reducción de la contaminación de carbamato de etilo en aguardientes de frutas de hueso y aguardientes de hollejo de frutas de hueso y al seguimiento de los niveles de carbamato de etilo en estas bebidas. DO L 52 de 3.3.2010, p. 53.

<sup>156</sup> Recomendación de la Comisión de 17 de marzo de 2010 relativa a la vigilancia de las sustancias perfluoroalquiladas en los alimentos. DO L 68 de 18.3.2010, p. 22.

<sup>157</sup> [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/index_en.htm) (Acceso: 28/10/2010).

<sup>158</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 79 (2007) 7473.

La figura 3.1.a muestra los diagramas de fases de los ácidos carboxílicos estudiados en mezclas de THF y agua. Los diagramas de fases para los ácidos sólidos a temperatura ambiente, concretamente decanoico, dodecanoico, tetradecanoico y hexadecanoico (puntos de fusión 31, 44, 54 y 62 °C, respectivamente), muestran tres regiones. En la región inferior (I), con bajos porcentaje de THF, los ácidos carboxílicos son insolubles. La región intermedia (C) es la correspondiente a la formación del SUPRAS, mientras que en la superior (L), el disolvente supramolecular es miscible con la mezcla hidroorgánica. La interfase I-C no es detectable para los ácidos octanoico y oleico a simple vista ya que son líquidos inmiscibles con agua a temperatura ambiente (punto de fusión a 16 y 14 °C, respectivamente) Para algunos sistemas ternarios (p. ej. ácido decanoico/metanol/agua, ácido decanoico/dimetilformamida/agua) la disolución en equilibrio con el disolvente supramolecular presenta turbidez.

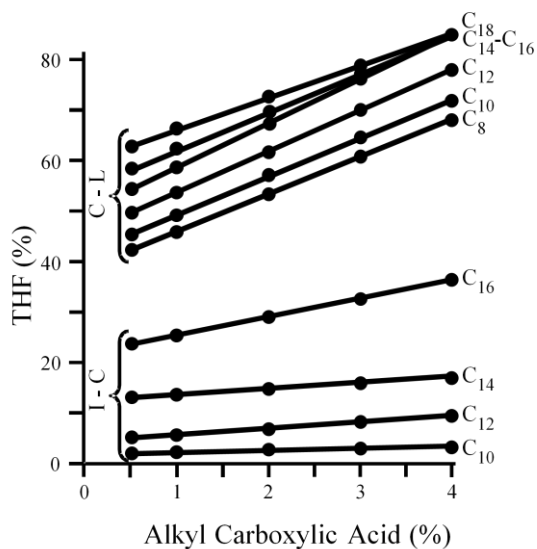


Figura 3.1.a. Diagramas de fases de las mezclas ternarias THF/ácido

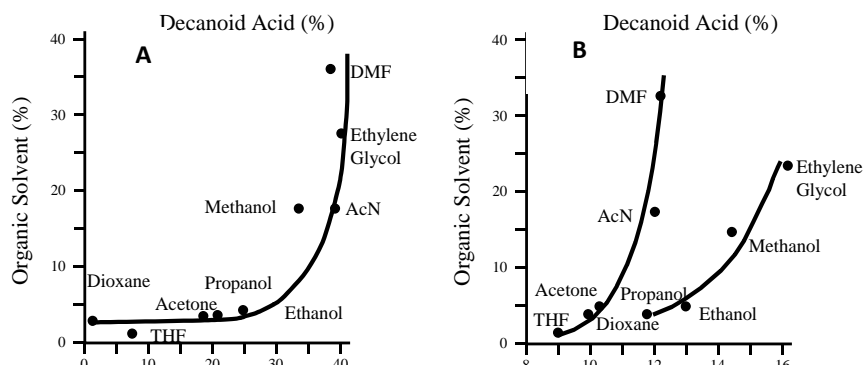
La composición de la mezcla hidroorgánica que define la interfase I-C depende de la longitud de la cadena del ácido, ya que el porcentaje de THF requerido para la solubilización del ácido y, por tanto, para la coacervación

del mismo aumenta con su hidrofobicidad. La región de formación del disolvente es en todos los casos lo suficientemente amplia para su uso en aplicaciones analíticas.

Por otro lado, la relación disolvente/agua a la que se define la interfase I-C depende en gran medida del tipo disolvente (Figura 3.1.b A y B). Esta interfase interesa que sea lo más baja posible para aplicaciones analíticas, de modo que el consumo de disolvente orgánico sea mínimo. Aunque existen pocos estudios relativos a la influencia de las características del disolvente en la coacervación de sistemas ternarios<sup>159</sup>, la polaridad y capacidad de los mismos para disolver macromoléculas son factores claves. En la Figura 3.1.b se muestra el porcentaje mínimo de disolvente que se requiere para la coacervación de un 1% de ácido decanoico (interfase I-C) y se representa en función de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ , Figura 3.1.b A) y del parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ , Figura 3.1.b B) de los disolventes próticos y apróticos ensayados. Para disolventes con valores de  $\epsilon$  inferiores a 25 no se observó dependencia entre el tipo de disolvente y el porcentaje del mismo requerido para coacervación (Figura 3.1.b A). Sin embargo para valores de  $\epsilon$  superiores a 30, el porcentaje de disolvente requerido para la solubilización y coacervación del ácido aumentó rápidamente al hacerlo el valor de  $\epsilon$ . Por otro lado, existe una dependencia definida con respecto al parámetro de Hildebrand (Figura 3.1.b B) y por lo tanto es un parámetro adecuado para la selección de disolventes en este tipo de coacervación.

---

<sup>159</sup> Saegusa, K.; Ishii, F. *Langmuir*, 18 (2002) 5984.



**Figura 3.1.b. Dependencia del porcentaje mínimo de disolvente orgánico requerido para la coacervación de un 1% w/v de ácido decanoico en función de la constante dieléctrica (A) y el parámetro de solubilidad de Hildebrand (B)**

Los disolventes próticos y apróticos formaron dos clústeres diferenciados como consecuencia de sus diferencias en la capacidad de formación de puentes de hidrógeno con los ácidos carboxílicos (alta y moderada, respectivamente). Los disolventes tanto próticos como apróticos con valores bajos de  $\delta$ , que son los que tienen mayor capacidad de solubilización para los ácidos carboxílicos, ofrecieron la mejor opción para aplicaciones analíticas, ya que en este caso el disolvente supramolecular se forma en mezclas hidroorgánicas a porcentajes de disolvente orgánico muy bajos. Entre ellos se seleccionó el THF, debido a su gran capacidad de solubilización de los ácidos carboxílicos seleccionados.

Para que se forme el disolvente supramolecular, los ácidos alquilcarboxílicos deben estar protonados ( $pK_a$  R-COOH =  $4.8 \pm 0.2$ ); por lo tanto su uso en extracciones analíticas implica que estas deben llevarse a cabo a valores de pH inferiores a 4.

### **3.2. Factores de concentración teóricos**

Los factores de concentración teóricos vienen dados por la ratio volumen de muestra/volumen de SUPRAS. El volumen obtenido de SUPRASs sigue una relación lineal con la cantidad de tensioactivo y exponencial con el porcentaje de THF. Otras variables experimentales como pH (hasta 0.1M de HCl), temperatura o fuerza iónica (expresada como concentración de NaCl) no afectan a los volúmenes de SUPRASs obtenidos.

Los factores de concentración que proporcionan los SUPRASs de micelas inversas de ácidos carboxílicos son muy superiores a los encontrados con SUPRAS de micelas acuosas inducidos por ácido o temperatura. La razón es la elevada concentración de anfífilo que poseen y que es aproximadamente 0.6 mg/ $\mu$ L. En cambio, para SUPRASs formados por micelas acuosas de SDS y de Tritón X-114 los valores son de 0.2 y 0.09 mg  $\mu$ L<sup>-1</sup>, respectivamente. Gracias a esta propiedad los SUPRASs de micelas inversas proporcionan elevados factores de concentración.

### **3.3. Eficiencia de extracción**

Los principales tipos de interacciones que proporcionan los SUPRAS de micelas inversas de ácidos carboxílicos son hidrofóbicas en la región exterior hidrocarbonada y puentes de hidrógeno a través de los grupos polares en el núcleo de las micelas. Así se esperan buenos rendimientos de extracción para compuestos anfífilos, hidrófobos y compuestos orgánicos con grupos donadores o aceptores de puentes de hidrógeno.

En la Tabla 3.3.a se muestran los rendimientos de extracción obtenidos para una variedad de analitos. Como se puede ver en la tabla, los rendimientos de extracción de compuestos anfífilos es elevada para no-iónicos como Triton X-100. La formación de agregados mixtos, favorecida por las interacciones entre los grupos RCOO<sup>-</sup>HOR y las interacciones hidrófobas entre las cadenas, facilitan su extracción. Sin embargo, para tensioactivos aniónicos, los rendimientos fueron cercanos a cero debido a su

alta solubilidad en agua. Esta diferencia de extracción es interesante para el desarrollo de métodos selectivos respecto a tensioactivos no-iónicos y aniónicos en aguas residuales.

**Tabla 3.3.a. Recuperaciones medias obtenidas para diferentes compuestos orgánicos usando SUPRASs de micelas inversas de ácido octanoico**

Interacción analito-SUPRAS	Analito	Concentración de analito (M)	<sup>a</sup> Recuperación ± S (%)
<b>Hidrofóbica</b>	Naftaleno	$3.9 \times 10^{-5}$	95 ± 2
	Antraceno	$2.8 \times 10^{-5}$	98 ± 1
	Pireno	$2.5 \times 10^{-5}$	100 ± 2
	Benzo(a)pireno	$2.0 \times 10^{-5}$	97 ± 1
<b>Formación de agregados mixtos</b>	Alquilbenceno sulfonatos	$2.9 \times 10^{-5}$	5 ± 1
	Triton X-100	$8.3 \times 10^{-5}$	98 ± 3
<b>Puentes de Hidrógeno</b>	4-Clorofenol	$3.9 \times 10^{-5}$	97 ± 2
	2,4- Diclorofenol	$3.1 \times 10^{-5}$	99 ± 1
	2,4,6-Triclorofenol	$2.6 \times 10^{-5}$	101 ± 1
	2,3,4,6-Tetraclorofenol	$2.1 \times 10^{-5}$	98 ± 2
	Pentaclorofenol	$1.9 \times 10^{-5}$	101 ± 1
	Bisfenol A	$3.8 \times 10^{-5}$	95 ± 3
	Bisfenol F	$3.6 \times 10^{-5}$	97 ± 1
	Butil bencil ftalato	$5.1 \times 10^{-5}$	99 ± 1
	Dibutil ftalato	$4.8 \times 10^{-5}$	100 ± 1
	Paration	$4.7 \times 10^{-5}$	96 ± 2
	Atrazina	$1.2 \times 10^{-4}$	95 ± 4
	Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi) acético	$1.1 \times 10^{-4}$	83 ± 3
	Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi) propanoico	$1.1 \times 10^{-6}$	85 ± 2
	Disperso Naranja 13	$3.54 \times 10^{-6}$	98 ± 3
	Ácido sulfónico de hidroquinona	$5.2 \times 10^{-5}$	95 ± 3

<sup>a</sup>Valor medio ± desviación estándar, n=3. 2% w/v Ácido octanoico, 10% THF

a aplicabilidad de los SUPRASs de micelas inversas es, en cualquier caso, amplia gracias a la ubicuidad de los grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno (alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos, éteres, ésteres, fenoles, etc.) entre los contaminantes orgánicos. Así, los rendimientos de extracción para una variedad de clorofenoles, bisfenoles, ftalatos, pesticidas, colorantes y

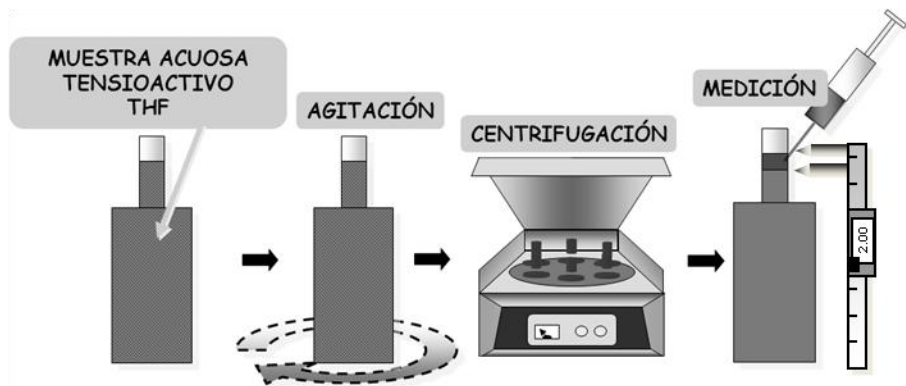
compuestos reveladores de fotografía fueron cuantitativos independientemente de su grado de polaridad ( $\log K_{ow}$ : 1.7- 5.9).

### **3.4. Metodología de extracción**

El uso de SUPRASs de micelas inversas para la extracción de contaminantes en muestras acuosas ambientales conlleva 4 etapas (simplificadas en la Figura 3.4.a):

1. **Generación in situ del disolvente supramolecular.** En un tubo de centrífuga de cuello estrecho, especialmente diseñado para la extracción con SUPRASs, se disuelve una determinada cantidad de ácido carboxílico en THF y se adiciona luego la muestra acuosa que causa la separación de fases y la aparición del SUPRAS.
2. **Extracción.** La disolución se agita ( $\sim 700$  rpm) con una varilla magnética, de modo que el SUPRASs se disgrega en gotas de pequeño tamaño y se acelera la extracción. En muestras acuosas el equilibrio se suele alcanzar en aproximadamente 1-2 minutos.
3. **Centrifugación.** La disolución se centrifuga (normalmente a 3000 rpm durante 5 minutos) para acelerar la separación de fases.
4. **Medición.** Se mide el volumen de SUPRAS generado teniendo en cuenta el diámetro interior del cuello estrecho del tubo (7-8 mm) y la altura de la columna cilíndrica que ocupa. Para obtener medidas más exactas se usa un pie de rey digital.





**Figura 3.4.a. Esquema de extracción usado en las metodologías con SUPRASs propuestas en este bloque**

#### **4. MEZCLAS DE THF: AGUA PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS PERFLUORADOS**

---

Los compuestos perfluorados (PFCs) constituyen un amplio grupo de contaminantes con distintas estructuras y funcionalidades, siendo considerados como prioritarios los ácidos y los sulfonatos y destacando entre ellos el perfluorooctanosulfonato (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Entre sus principales aplicaciones industriales se encuentran la fabricación de plásticos, espumas ignífugas, y productos repelentes de grasas y agua en productos alimenticios y envases. Debido a su uso masivo y su elevada persistencia y capacidad de bioacumulación existe una contaminación global por PFCs en los ecosistemas terrestres y acuáticos<sup>160,161</sup>. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido límites de tolerancia diaria de 150 and 1500 ng kg<sup>-1</sup> peso corporal día<sup>-1</sup> para PFOA y PFOS<sup>149</sup> y la UE ha recomendado su vigilancia en alimentos<sup>156</sup> como una de las principales fuente de exposición a estos contaminantes. Para evaluar este

---

<sup>160</sup> K. Kannan, J. Koistinen, K. Beckmen, T. Evans, J.F. Gorzelany, K.J. Hansen, P.D. Jones, E. Helle, M. Nyman, J.P. Giesy, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1593.

<sup>161</sup> M. Houde, J.W. Martin, R.J. Letcher, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 3463.

riesgo se necesitan metodologías analíticas adecuadas, que sean simples, robustas y con sensibilidad adecuada para alcanzar los bajos niveles ( $\text{pg g}^{-1}$ ) a los que se encuentran estos compuestos.

Los compuestos perfluorados (*perfluorinated compounds*, PFCs) son marcadamente anfífilicos. Poseen un grupo polar que es, en el caso de los ácidos, donador y aceptor de puentes de hidrógeno y en el caso de sulfonatos, sólo aceptor debido a su carácter aniónico; y por otro lado, contienen una cadena hidrocarbonada cuya hidrofobicidad está acentuada por la presencia de flúor. Por esta razón la extracción de PFCs de muestras acuosas o sólidas de tipo ambiental, agroalimentario o biológico sigue siendo compleja<sup>162,163,164</sup>.

Actualmente existen pocas metodologías para el análisis de PFCs en alimentos<sup>165,166,167</sup>. Las estrategias actuales conllevan un elevado consumo de disolvente orgánico y tiempo y proporcionan recuperaciones que son muy dependientes del tipo de matriz y analito, debido al amplio intervalo de polaridad de los compuestos, cuya longitud de cadena varía entre 4 y 14 átomos de carbono. Las metodologías más comunes usan disolventes de polaridad media como metanol o acetonitrilo para la extracción, seguida de una serie de etapas de limpieza, generalmente realizadas con carbón activo y resinas de intercambio aniónico.

Las mezclas de tetrahidrofurano y agua poseen una excelente capacidad de solubilización para compuestos anfífilicos, debido a la gran diferencia que presentan estos disolventes en los valores de constante dieléctrica ( $\epsilon$  agua = 80;  $\epsilon$  THF = 7.5) y parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta$  agua = 23.3

---

<sup>162</sup> J.W. Martin, K. Kannan, U. Berger, P. de Voogt, J. Field, J. Franklin, J.P. Giesy, T. Harner, D.C.G. Muir, B. Scott, M. Kaiser, U. Jarnberg, K.C. Jones, S.A. Mabury, H. Schroeder, M. Simcik, C. Sottani, B. Van Bavel, A. Karrman, G. Lindstrom, S. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 248A.

<sup>163</sup> S.P.J. van Leeuwen, A. Karrman, B. van Bavel, F. de Boer, G. Lindstrom, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7854.

<sup>164</sup> S.P.J. van Leeuwen, K. Swart, I. Van der Veen, J. de Boer, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 401

<sup>165</sup> S.A. Tittlemier, K. Pepper, C. Seymour, J. Moisey, R. Bronson, X.-L. Cao, R.W. Dabeka, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3203

<sup>166</sup> I. Ericson, R. Martí-Cid, M. Nadal, B. Van Bavel, G. Lindström, J.L. Domingo, *J. Agric. Food. Chem.* 56 (2008) 1787

<sup>167</sup> A.S. Lloyd, V.A. Bailey, S.J. Hird, A. Routledge, D.B. Clarke, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2923

$\text{cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ;  $\delta_{\text{THF}} = 9.5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ). Gracias a estas diferencias, el disolvente THF:agua proporciona un balance de interacciones (dispersivas, puentes de hidrógeno y polares) adecuadas tanto para la solubilización del grupo polar como de la cadena hidrófoba del tensioactivo y presumiblemente se forman agregados inversos similares a los formados por los ácidos carboxílicos. Esta propiedad se ha aprovechado para el desarrollo de una metodología para la extracción de compuestos perfluorados en alimentos, investigación que se llevó a cabo durante la estancia realizada en el *Institute of Environmental Studies* de la *Vrije University of Amsterdam* (Holanda) bajo la supervisión del Dr. Stefan van Leuween durante los meses de Junio a Septiembre de 2009, y que fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

# Capítulo 1

---

***Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry***

---



---

**Determination of Bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry\***

---

**ABSTRACT**

A simple, rapid and sensitive analytical method was developed for the simultaneous determination of bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF) and their corresponding diglycidyl ethers (BADGE and BFDGE) in wastewater and river water, in order to have a useful tool for evaluating their fate and distribution in aquatic environments. It was based on their extraction with coacervates made up of decanoic acid reverse micelles and subsequent determination by liquid chromatography–fluorimetry. The procedure involved the extraction of 10.8 mL of water sample for 5 min, its centrifugation for 10 min to accelerate phase separation and then the chromatographic analysis of the target compounds. Clean-up or solvent evaporation steps were not necessary to get the required sensitivity and selectivity. Extraction efficiencies and concentration factors mainly depended on the amount of decanoic acid and tetrahydrofuran making up the coacervate. A general equation for the prediction of the volume of the coacervate as a function of its components has been proposed and fitted by nonlinear regression. This equation permits to know a priori the maximum concentration factors that can be achieved under given experimental conditions. 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. Recoveries in samples ranged between about 80 and 92% and the actual concentration factors were between 87 and 102, which resulted in

**\*A. Ballesteros-Gómez, F.-J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito,  
*Anal. Chim. Acta*, 603 (2007) 51–59**

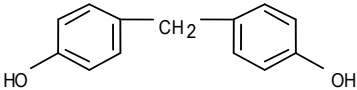
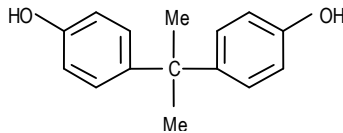
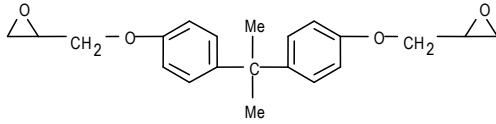
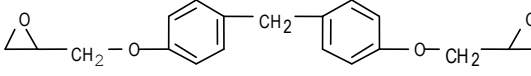
practical detection limits around 30–35 ng L<sup>-1</sup>. The method was successfully applied to the determination of the target pollutants in raw and treated sewage from four mechanical-biological treatment plants and three rivers. Bisphenols and their diglycidyl ethers were present in wastewater influents at concentrations in the range 0.96 to 1.6 µg L<sup>-1</sup>. The biological treatment at the wastewater treatment plants (WWTPs) studied reduced the concentration of BPA and BPF in a percentage above 75%, while diglycidyl ethers were not detected in most of the effluents investigated. Only BPA was detected in surface waters.

## **1. INTRODUCTION**

---

Bisphenols A (BPA) and F (BPF) are extensively used as leading chemicals in plastics [1] with a variety of industrial applications, including digital media products (e.g. CDs, DVDs), electrical and electronic equipment, lacquer coatings in cans, and dental composites and sealants [2,3]. Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) are epoxy resins obtained by reaction of their respective monomers, BPA and BPF, with epichlorohydrin [4]. The chemical structure and some physical properties of these toxics are shown in Table 1.

Occurrence of BPA in the aquatic environment has been widely reported [5–10], its presence largely arising from factories where it is produced or used as a starting material. Levels found for BPA in surface water and wastewater vary over a wide range (e.g. 5–500 ng L<sup>-1</sup> in several German rivers, lakes and channels and 20–700 ng L<sup>-1</sup> in different German sewage effluents [6]), nevertheless they do not usually exceed 1 µg L<sup>-1</sup>[11]. Concern has been raised in recent years about the toxicity of BPA to aquatic organisms, which has been mainly related to its estrogenic activity [12]. Predicted no-effect concentrations (PNEC<sub>water</sub>) for BPA in the range 0.1–1 µg L<sup>-1</sup> have been proposed [11,13–15].

Table 1. Physical properties and chemical structures of bisphenols			
	Chemical structure	Water solubility (mg L <sup>-1</sup> )	log <sup>a</sup> K <sub>ow</sub>
BPF		360	2.91
BPA		89	3.25
BFDGE		14	3.32
BADGE		5	3.95

<sup>a</sup> octanol-water partition coefficients

As with BPA, release of BPF, BADGE and BFDGE into the environment is possible during manufacturing and by leaching from final products. Data for BPF in the aquatic environment are scarce and, on the whole, it is present at significantly lower levels than BPA (e.g. 0.1–180 and 22–123 ng L<sup>-1</sup> in German surface waters and wastewaters, respectively [6]). To our knowledge, no data have been reported on the concentrations of BADGE and BFDGE in the aquatic environment. Although no information is available about the ecotoxicity of BPF, BADGE or BFDGE [16], the toxicity of BPF has been proven and it is mainly related to its estrogenic [17] and strong antiandrogenic [18] effects, while that of BADGE and BFDGE is related to their cytotoxic effects [19], which make them tumorigen and mutagen [20]. So, in order to have a more real assessment of the



environmental impact caused by the chemicals released from plastic processes and products, the environmental concentrations and ecotoxicity of BPF, BADGE and BFDGE should be also taken into consideration [6] and this issue demands research.

Most analytical methods proposed in recent years to determine endocrine disruptors in rivers and municipal/industrial wastewaters only include the determination of BPA. In general, because of the complexity of the mixtures analysed, these methods are based on gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) or liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and require a laborious sample treatment step, largely involving the solid phase extraction (SPE) or liquid–liquid extraction (LLE) of sample volumes between 0.5 and 10 L [7,21–23]. Measurement of BPA in the aquatic environment can be made simpler using solid-phase microextraction (SPME) [24] or stir bar sorptive extraction (SBSE) [25] combined with GC/MS. In this way, quantification limits around  $10 \text{ ng L}^{-1}$  can be obtained. Few methods have been proposed for the simultaneous determination of BPA and BPF in wastewater and rivers [6,7]. They are based on LLE or SPE of high sample volumes (1–2 L) and subsequent solvent evaporation. To our knowledge, only one analytical method has been reported for the simultaneous determination of BPA, BPF, BADGE and BFDGE in aquatic environments [26]. It consist in a LLE of 0.5 L water sample, evaporation to dryness and subsequent determination by GC–MS. Quantification limits for BFDGE and BADGE were  $450$  and  $300 \text{ ng L}^{-1}$ , respectively, which was well above the concentrations expected for these toxics in environmental waters.

This work deals with the development of a simple, rapid and sensitive method for the simultaneous determination of BPA, BPF, BADGE and BFDGE in aquatic environments, in order to have an effective tool to assess their environmental impact. It is based on the coacervative extraction of the analytes and their subsequent determination by LC–fluorescence detection. Coacervates are water immiscible liquids that separate from colloidal solutions by the action of a dehydrating agent, namely temperature, pH, electrolyte or a non-solvent for the macromolecule [27,28]. After separation,

the coacervate contains most of the colloid and is in a dynamic equilibrium with the initial solution. In analytical extractions, the aqueous sample solution is made colloidal by the addition of surfactants at concentrations above their critical aggregation concentration. So the coacervate, that is the extractant, is produced in situ in the bulk sample solution. The most used surfactant aggregates in analytical extractions have been aqueous non-ionic [29–31], amphoteric [32], anionic [33] and cationic [34] micelles. Recently, coacervates made up of vesicles [35] and reversed micelles [36] of alkyl carboxylic acids have been reported by our research group, which permit the extraction of analytes in a wide polarity range. The main advantages of coacervative extraction, usually named in the analytical literature as cloud point extraction (CPE), are high efficiency and concentration factor, low cost, safety and environmental friendliness.

In this study the suitability of coacervates made up of reverse micelles of alkyl carboxylic acids to extract bisphenols from wastewater and rivers was assessed. The selection of this coacervate was based on its potential to extract efficiently the target compounds and the high concentration factors that can be reached. The aim was to have a simple method for the simultaneous determination of these compounds at the levels they can have some significance for the environment. Below, the parameters affecting the extraction efficiency and concentration factor are optimised and the method is applied to the determination of the target compounds in river and wastewater.

## **2. EXPERIMENTAL**

---

### ***2.1. Chemicals***

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. The alkyl carboxylic acids, decanoic (capric), dodecanoic (lauric) and tetradecanoic (miristic) were obtained from Fluka (Madrid, Spain). Octanoic acid (caprylic) was acquired from Riedel-de Hën (Seelzen, Germany).

Tetrahydrofuran (THF) and LC-grade acetonitrile were supplied by Panreac (Sevilla, Spain) and ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Tetrabutylammonium bromide was obtained from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI). Bisphenol A [BPA; 2,2\_-bis(4-hydroxyphenyl)propane], bisphenol F [BPF; bis(4-hydroxyphenyl)methane], bisphenol A diglycidyl ether [BADGE; bis(4-hydroxyphenyl)dimethylmethane diglycidyl ether] and bisphenol F diglycidyl ether [BFDGE; bis(4-hydroxyphenyl)methane diglycidyl ether] were obtained from Fluka (Madrid, Spain). BFDGE was supplied as a mixture of three position isomers (*ortho–ortho*, *ortho–para*, *para–para*) whose relative proportions were unknown. A stock standard solution containing a mixture of bisphenols, 1 g L<sup>-1</sup> each, was prepared in acetonitrile and stored under dark conditions at 4 °C. Working solutions were made by appropriate dilutions of the stock solution with acetonitrile.

## **2.2. Apparatus**

The liquid chromatographic system used (Spectra System SCM1000, ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisted of a P4000 quaternary pump, a UV6000LP diode-array detector and a FL3000 fluorescence detector. In all experiments, a Rheodyne 7125 NS injection valve, with a 20 µL sample loop, was used (Thermo Quest). The stationary-phase column was a Hipersil ODS C18 column (5 µm, 4.6mm×150mm) from Análisis Vinicos (Tomelloso, Spain). A Mixtasel Selecta centrifuge (Barcelona, Spain) was used for sample preparation.

## **2.3. Optimisation studies**

The optimisation of the extraction process was carried out by studying the influence of different parameters on both the extraction efficiencies and concentration factors obtained for bisphenols. Experiments were made by dissolving alkyl carboxylic acids (C<sub>8</sub>–C<sub>14</sub>, 0.1–4%) in tetrahydrofuran (2–40%) into specially designed centrifuge tubes that had narrow necks (~7 mm i.d.).

Then, an appropriate volume of aqueous solution containing a mixture of BPA, BPF, BADGE, BFDGE,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  each, at pH between 1 and 4 was added (final volume of the solution = 40mL). Immediately, an immiscible alkyl carboxylic acid-rich phase, named coacervate, separated from the bulk solution. The mixture was stirred (700 rpm, 1–60 min, 20–60 °C) to extract the analytes and then centrifuged (3500 rpm, 10min) to speed up the separation of the two phases. The volume of the coacervate was calculated by measuring its height in the cylindrical neck of the tube with a digital calliper. Finally, the coacervate was transferred to a 2-mL flask using a microsyringe, made up to the mark with acetonitrile and 20  $\mu\text{L}$  of the resulting solution was injected into the LC–FL system. Given that the presence of the surfactant in the extract did not alter the chromatographic signals or the retention times of bisphenols, calibration curves were performed using standards dissolved in acetonitrile. The coacervate volume estimates were analysed by nonlinear regression (statistical program SPSS V.11.5) in order to define a prediction equation for the volume of the coacervate under given experimental conditions. All the optimisation experiments were performed in triplicate.

## ***2.4. Determination of bisphenols in river and wastewater samples***

### ***2.4.1. Sample collection and preservation***

Wastewater samples were collected in March 2007 from different municipal wastewater treatment plants (WWTPs) (Linares, Bailén, Mengíbar and Lucena) and rivers (Guadalquivir, Rabanales and Dos Torres) all of them located in the South of Spain. Although the composition of influents in these WWTPs, which are a mixture of industrial and domestic wastewater, is very variable, estimated data of the industrial percentage were supplied by the personnel of the WWTPs: 30–50% for Linares WWTP (mainly from the car and engineering industries); 20–40% for Bailén WWTP (principally from

brickworks, ceramic and olive oil industries) and 40–50% for Lucena (from the furniture and bronze factories). Mengibar WWTP receives mainly domestic influents. After collecting the samples in dark glass containers, they were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  filters (Watman GF/F Osmonics, France) in order to remove suspended solids and adjusted to pH 2 by the addition of concentrated nitric acid. They were finally stored in amber bottles at 4 °C until analysis.

#### **2.4.2. Coacervate-based extraction**

Decanoic acid (60 mg) was dissolved in THF (1.2 mL) into centrifuge tubes which had a narrow neck (~7mm i.d.). Afterwards, a river or wastewater sample (10.8 mL) at pH 2 was added, which induced the formation of a water immiscible decanoic acid-rich coacervate. The mixture was stirred (700 rpm, 5 min) to increase the extraction rate of analytes, and then centrifuged (3500 rpm, 10min) to accelerate the separation of the coacervate from the bulk solution. After the measurement of the volume of the coacervate, which was standing at the top of the solution in the narrow neck of the centrifuge tube, an aliquot (20  $\mu\text{L}$ ) was withdrawn using a microsyringe and directly injected into the LC–FL system.

#### **2.4.3. Liquid chromatography–fluorimetry**

Separation and quantification of BAP, BPF, BADGE and BFDGE was carried out by liquid chromatography–fluorimetry. Acetonitrile (solvent A) and water (solvent B) were used as eluents at a flow rate of 1mL/min. The gradient elution program was as follows: from 45 to 55% A in 7 min, from 55 to 59% A in next 5min and, finally, from 59 to 45% A for 5min for reconditioning of the column. The column effluent was monitored at 280nm of exciting wavelength and 306 nm of emission wavelength. Quantification was performed by measuring peak areas. The selected chromatographic conditions permitted the separation of the three BFDGE isomers. Calibration for this pollutant was based on the sum of the peak areas corresponding to the three isomers. Calibration curves for bisphenols A, F

and their diglycidyl ethers were constructed in the concentration range 10–500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Coacervative extraction of bisphenols

#### 3.1.1. Description and bonding capabilities of reverse micelle-based coacervates

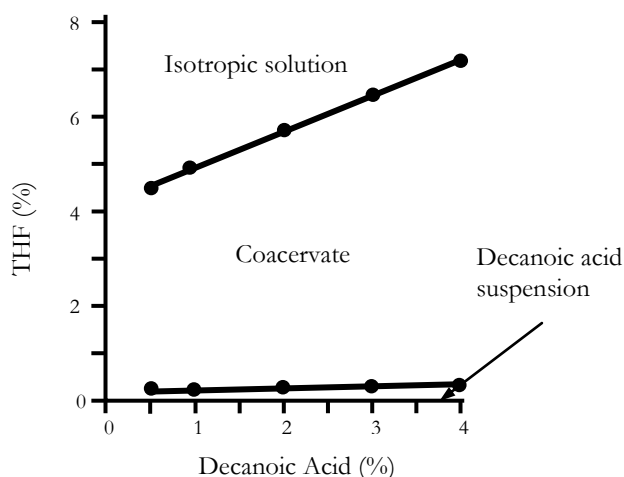
Protonated alkyl carboxylic acids ( $\text{pK}_a = 4.8 \pm 0.2$ ) are sparingly soluble in water. They dissolve in THF, where they self-assemble as reverse micelles according to a sequential type self-association model. The addition of water to these solutions causes partial desolvation of the reverse micelles, which makes easier micelle–micelle interaction and leads to the formation of bigger aggregates. As a result, these aggregates become insoluble in the water:THF solution and separate as a immiscible liquid. At a microscopic level, the coacervate consists of spherical droplets, made up of a variable number of reverse micelles, dispersed in a water:THF continuous phase.

The excellent dissolution properties of reverse micelles and the low volume of the coacervates obtained make them very attractive for analytical extractions. Since the coacervation phenomenon occurs from protonated alkyl carboxylic acids, extractions must be carried out below pH 4. Alkyl carboxylic acid reverse micelles provide a two-fold mechanism for substrate solubilisation, namely hydrophobic interactions in the surfactant tails at the micellar surface and hydrogen bonds in the polar headgroups at the micellar core. Bisphenols are relatively polar compounds (see log  $K_{ow}$  values in Table 1). They are neutral ( $\text{pK}_a$  for BPA and BPF are 9.73 and 9.67, respectively) in the pH range in which coacervates are produced (below 4). So, the expected driving forces for extraction of bisphenols were both hydrogen bonds between the carboxylic groups of reverse micelles and the alcohol/ether

groups of analytes, and Van der Waals interactions between the hydrophobic regions of analytes and coacervates.

### ***3.1.2. Optimisation of coacervative extraction process***

Optimisation studies were carried out following the procedure described in Section 2.3. Selection of the optimal conditions was based on the recoveries (Rs) and actual concentration factors (ACFs) obtained for bisphenols. Phase volume ratios (PVRs) were calculated as the ratio of sample volume over coacervate volume, so they represented the maximum concentration factors that could be obtained under given experimental conditions. Coacervates made up of octanoic, decanoic, dodecanoic and tetradecanoic acids were assessed as extraction solvents. The largest recoveries (between 90 and 96%) were obtained by using decanoic and dodecanoic acids. The recoveries slightly decreased for octanoic (86–91%) and tetradecanoic (79–85%). The volume of coacervate obtained slightly increased as the alkyl chain of the carboxylic acid did (e.g. around 2% per carbon atom); accordingly, the PVRs provided by the corresponding coacervates decreased. Maximal ACFs for bisphenols were obtained for coacervates made up of decanoic acid, so they were selected as extractants. Fig. 1 depicts the region encompassed by the coacervate as a function of THF and decanoic acid concentrations. THF percentages below and above the boundaries of this region caused precipitation and solubilisation of decanoic acid, respectively.



**Figure 1. Phase diagram of decanoic acid in binary mixtures of THF:water. Final volume of the solution (THF +water) = 40mL Experiments made at room temperature.**

### Phase volume ratios

The coacervates used for extraction consisted of decanoic acid reverse micelles dispersed in a THF:water continuous phase and they were in equilibrium with the THF:water sample solution. It was checked that phase volume ratios (PVRs) depended on both the decanoic acid amount and THF concentration. A series of experiments were carried out to develop an equation for the prediction of the coacervate volume as a function of the decanoic acid amount and tetrahydrofuran percentage. The aim was to be able to predict the maximum concentration factor that could be obtained under given experimental conditions. For this purpose, a set of coacervates was prepared using a variety of decanoic acid amounts (10–500 mg) and THF concentrations (2.5–50%). The volumes obtained were measured with a digital calliper. The water percentage of the solution was not considered a predictor variable of the coacervate volume. Although the water content is implicit in the THF variable since they are expressed by volume percent, i.e.  $\text{THF} = 100 - \text{water} (\%, v/v)$  it was not expected to be incorporated into the



extractant phase in a significant proportion, probably due to of its non-solvent character for the reverse micelles.

Table 2 shows the figures of merits of the linear relationship found between the amount of decanoic acid (10–500 mg) and the coacervate volume, at different THF percentages. This type of dependence is typical for surfactant-based extractions and it indicates that the composition of the surfactant rich-phase keeps constant as the other variables remain unchanged. The slope of the linear relationship gives the microliters of coacervate obtained per mg of surfactant, so maximum concentration factors will be found under conditions where the lower slope values are obtained (e.g. at low percentages of THF, Table 2).

<b>Table 2. Figures of merits of the linear relationship (<math>y = a + bx</math>) between the coacervate volume (<math>y</math>, <math>\mu\text{L}</math>) and the amount of decanoic acid (<math>x</math>, mg) at different THF percentages</b>			
<b>THF (%)</b>	<b><math>b \pm S^a</math> (<math>\mu\text{L mg}^{-1}</math>)</b>	<b><math>a \pm S^a</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b><math>R^{2b}</math></b>
5	1.31±0.03	3.46±2.76	0.997
10	1.67±0.04	0.67±3.99	0.997
20	2.64±0.03	-3.19±3.36	0.998
30	4.00±0.04	20.10±10.65	0.998
<sup>a</sup> standard deviation ; <sup>b</sup> correlation coefficient ; $n = 10$			

The relationship between the coacervate volume and the THF percentage was exponential (see Table 3) and independent of the amount of decanoic acid considered. The parameter ( $b_1$ ), which describes how rapidly the coacervate volumes increases as the THF (%) does, was found to be similar in all the experiments (mean value around  $\sim 0,04$ ), thus indicating that it only depended on the THF percentage. On the contrary, the parameter  $b_0$  was related to the decanoic acid amount, in fact there was a linear relationship between  $b_0$  and the amount of surfactant (see Table 3).

<b>Table 3. Figures of merits of the exponential relationships (<math>y = b_0 e^{b_1 x}</math>) between the coacervate volume (<math>y</math>, <math>\mu\text{L}</math>) and the concentration of THF (<math>x</math>, %) at different amounts of decanoic acid</b>			
<b>Decanoic acid (mg)</b>	<b><math>b_0 \pm S^a</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b><math>b_1 \pm S^a</math></b>	<b><math>R^2</math><sup>b</sup></b>
20	20.62 $\pm$ 0.53	0.0471 $\pm$ 0.0164	0.997
50	53.43 $\pm$ 1.59	0.0479 $\pm$ 0.0011	0.998
75	75.47 $\pm$ 4.57	0.0489 $\pm$ 0.0021	0.992
100	106.55 $\pm$ 3.33	0.0454 $\pm$ 0.0009	0.998
200	204.99 $\pm$ 7.21	0.0454 $\pm$ 0.0019	0.996

<sup>a</sup> standard deviation ; <sup>b</sup> correlation coefficient ;  $n = 10$

Nonlinear regression was used to fit a model to the data obtained ( $n = 60$ ). This procedure uses an iterative approach to minimize the sum-of-squares of the vertical distances of the experimental points to a proposed curve based on preliminary estimates [37]. Taking into account that the dependence of the coacervate volume with THF percentage and decanoic acid amount was exponential and linear, respectively, the model proposed was  $y = \Theta_1 a e^{\Theta_2 b}$ . The dependent variable,  $y$  was the coacervate volume in  $\mu\text{L}$ , while the independent variables  $a$  and  $b$  were the amount of decanoic in mg and the THF in percentage (v/v), respectively. The units of the parameter  $\Theta_1$  were  $\mu\text{L mg}^{-1}$ , while the parameter  $\Theta_2$  was dimensionless. On the basis of the experimental data obtained, the initial values proposed for  $\Theta_1$  and  $\Theta_2$  were 1.00 and 0.04, respectively. The resultant equation, after 10 iterations using the Levenberg–Marquardt method, was  $y = 1.035a e^{0.04731b}$ . The asymptotic standard errors of  $\Theta_1$  and  $\Theta_2$  were 0.018 and 0.0009, respectively. The correlation coefficient was 0.995, thus indicating the high capability of prediction of this equation. So, the maximum concentration factors that can be achieved with decanoic acid reverse micelle-based coacervates under given conditions can be known a priori and this makes easier method selection and optimisation.

## Recoveries and actual concentration factors

The influence of variables on recoveries was studied and the actual concentration factors, ACFs ( $0.01 \cdot R(\%) \cdot PVR$ ) were calculated from the coacervate volumes predicted by the general equation proposed above. Decanoic acid concentration was the most influential parameter on recoveries. Recoveries higher than 79% were obtained for all the target compounds at decanoic acid concentrations as low as 0.5% (Table 4). A concentration of 0.5% was selected as optimal on the basis that it provided the best possible ACFs for bisphenols at the usual threshold recoveries recommended for the determination of pollutants in environmental samples (70%) by different international organisations [38–40].

Decanoic acid (%)	Recovery $\pm$ <sup>a</sup> S (%)			
	BPA	BPF	BADGE	BFDGE
1	52 $\pm$ 6	45 $\pm$ 5	66 $\pm$ 4	65 $\pm$ 5
0.25	76 $\pm$ 4	67 $\pm$ 3	87 $\pm$ 5	87 $\pm$ 4
0.5	83 $\pm$ 3	79 $\pm$ 2	94 $\pm$ 3	90 $\pm$ 4
1	92 $\pm$ 3	90 $\pm$ 1	92 $\pm$ 4	92 $\pm$ 2
2	95 $\pm$ 4	93 $\pm$ 2	99 $\pm$ 3	100 $\pm$ 1
3	100 $\pm$ 3	96 $\pm$ 2	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 2

<sup>a</sup>Standard deviation;  $n = 3$ ; THF= 10%

Recoveries for bisphenols were independent of THF concentrations higher than 10% and decreased as the THF concentration did at lower percentages (Table 5). According to previous studies [36], decanoic acid incorporates progressively to the coacervate from the bulk solution at low THF concentrations and it reaches maximal incorporation at 10% THF and remains steady from here on. So, recoveries for bisphenols depended only and directly on the amount of decanoic acid in the coacervate and THF did not influence them. We selected 10% THF, which gave the maximal ACFs for recoveries higher than 75%.

Table 6 shows the phase volume ratios inferred from the general equation and the range of ACFs calculated for bisphenols, considering the recovery values shown in Table 4. A practical aspect to be considered was the volume of environmental sample to analyse, because although it does not influence recoveries or concentration factors, it determines the total mass of decanoic acid at a given surfactant concentration and consequently the volume of coacervate obtained. Our criterion was to get around 100  $\mu\text{L}$  of coacervate per sample, which permitted 2–3 different chromatographic runs in a reliable way (20  $\mu\text{L}$  each injection).

%THF	Recovery $\pm$ <sup>a</sup> S (%)			
	BPA	BPF	BADGE	BFDGE
2	61 $\pm$ 5	54 $\pm$ 2	75 $\pm$ 4	69 $\pm$ 2
5	71 $\pm$ 4	67 $\pm$ 2	86 $\pm$ 3	79 $\pm$ 2
10	83 $\pm$ 3	80 $\pm$ 3	94 $\pm$ 3	90 $\pm$ 1
20	81 $\pm$ 3	80 $\pm$ 4	94 $\pm$ 3	86 $\pm$ 2
30	80 $\pm$ 4	79 $\pm$ 3	94 $\pm$ 4	85 $\pm$ 2
40	83 $\pm$ 2	80 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4	85 $\pm$ 3

<sup>a</sup>Standard deviation;  $n = 3$ ; decanoic acid = 0.5%

Table 6 indicates the minimal sample volume that should be analysed to meet this requirement for each of the decanoic acid concentrations investigated. Detection limits below 100  $\text{ng L}^{-1}$ , were obtained using decanoic acid concentrations lower than 1% of decanoic acid. Under the selected experimental conditions (0.5% decanoic acid, 10% THF) detection limits around 30–35  $\text{ng L}^{-1}$  were obtained for all the target compounds. Sensitivities were very similar for all the bisphenols.

Recoveries for bisphenols were not affected by the pH in the range 1–4, which is logical considering the type of interactions expected to be the driving forces for the extraction. The pH of the samples, previously adjusted to 2 for their preservation, was maintained during extraction. The addition of NaCl to samples over the concentration range  $10^{-3}$ –1 M or the increase of the temperature of the sample solution from 25 to 60  $^{\circ}\text{C}$  did not affect

bisphenol extraction efficiencies or concentration factors. The time necessary to reach extraction equilibrium conditions using the procedure proposed was about 5min. An increase of about 7% in recoveries for bisphenols was found from 1 to 5 min and remained steady from here on.

<b>Table 6. Phase volume ratios, minimal sample volume required to get 100 <math>\mu\text{L}</math> of coacervate and method detection limits for different decanoic acid concentrations</b>				
<b>Decanoic acid (%)</b>	<b>Phase volumes ratios</b>	<b>Actual concentration factors</b>	<b>Minimal sample volume (mL)</b>	<b>LOD (<math>\text{ng L}^{-1}</math>)</b>
0.1	542	358-244	54	12-8
0.25	217	189-145	22	21-16
0.5	108	102-87	11	35-30
1	54	50-49	5	62-60
2	27	27-25	3	119-111
THF= 10%				

### **3.2. Analytical performance**

Calibration curves for the target compounds were run using standard solutions prepared in acetonitrile. No differences in peak areas or retention times were observed for the analytes injected in organic solvent or coacervates. The retention times of the analytes, expressed in min, were 3.7 for BPF, 5.2 for BPA, 10.1, 10.5 and 10.7 for the BFDGE isomers I, II and III; respectively and 11.7 for BADGE. Correlation between peak areas and bisphenols concentrations ( $10\text{--}500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were determined by linear regression and were in the range 0.995–0.998, indicating good fits. The slope of the calibration curves were  $721\pm 12$ ,  $689\pm 20$ ,  $1311\pm 38$  and  $1648\pm 32 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$  for BPA, BPF, BADGE and BFDGE, respectively ( $n = 7$ ). The instrumental detection limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3. They were estimated to be  $\sim 3 \mu\text{g L}^{-1}$ . From

this value and considering the actual concentration factors, the detection limits of the method were estimated to be around  $35 \text{ ng L}^{-1}$  for BPA and BPF and  $30 \text{ ng L}^{-1}$  for BADGE and BFDGE. Under the experimental conditions proposed for their determination, recoveries for BPA/BPF and BADGE/BFDGE were  $\sim 80$  and  $\sim 92\%$ , respectively, in the whole range of concentrations tested, with standard deviations in the interval 2–5%.

Lower detection limits can be achieved for bisphenols by decreasing the amount of decanoic acid used to extract the samples (e.g. 0.1 or 0.25%, see Table 6). However, the sample volume have to be increased and recoveries for all the bisphenols or some of them decrease below 75% making advisable to run calibration using the whole procedure, that is with the same experimental conditions (i.e. including extraction of the standards in distilled water) as selected for the analysis of unknown water samples.

The possible interference of matrix components that could elute with bisphenols was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves ( $n = 7$ ) obtained from standards in distilled water with those obtained from three wastewater and two river water samples, fortified with known amounts of bisphenols, and run using the whole procedure. The slopes of the calibration curves performed in distilled water were  $63 \pm 4$ ,  $60 \pm 3$ ,  $138 \pm 7$ ,  $159 \pm 10 \text{ L ng}^{-1}$ . The difference between these slopes and those obtained from the five environmental samples were found to be not statistically significant by applying the two-samples  $t$ -tests [41]. The experimental  $t$ -values were in the range 0.5–1.3 and were below the critical  $t$ -value (2.09), being significance established at 0.05 levels. Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of the target compounds, although aquatic samples of very different origin should be checked for selectivity.

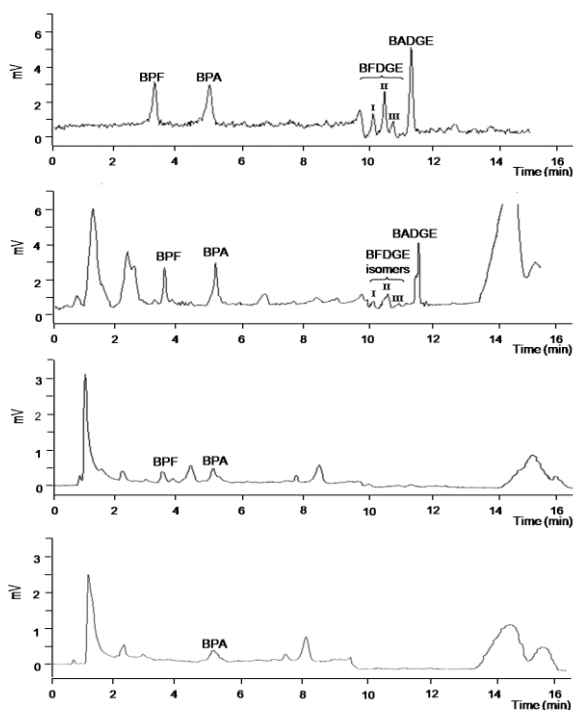
### **3.3. Analysis of environmental water samples**

To prove the suitability of the proposed method to work under real conditions, it was applied to the determination of bisphenols in three rivers and four different WWTPs. Table 7 shows the concentrations found for BPA, BPF, BADGE and BFDGE as well as the recoveries obtained after spiking the samples with known amounts of each bisphenol. Values for concentrations of bisphenols and for recoveries were expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. Recoveries were ranged between 80 and 90 for BPA, 79 and 82 for BPF, 90 and 96 for BADGE and 88 and 91 for BFDGE with relative standard deviations ranged in 1–8%.

All the target compounds were present in most of the wastewater influents analysed indicating their ubiquity and the need of studying their fate and distribution in the aquatic environment. The biological treatment at the WWTPs studied reduced the concentration of BPA and BPF in a percentage above 75%, while diglycidyl ethers were not detected in any of the effluents investigated, except for BADGE at Bailén WWTP. Only BPA was detected in surface waters although its concentration was above the limits recommended by the EU for organic pollutants in waters ( $0.1\text{-g L}^{-1}$ ) [42]. Special high levels were found in the river Dos Torres, which receives domestic wastewater from a mechanical treatment WWTP.

<b>Table 7. Mean concentrations (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>) <math>\pm</math> standard deviation (n=3) and recoveries (%) of target analytes found in wastewater influent and effluent samples and river water samples</b>				
<b>Sample Location</b>	<b>BPA</b>	<b>BPF</b>	<b>BADGE</b>	<b>BFDGE</b>
<b>WWTP Influent<sup>a</sup></b>				
<i>Linares</i>	1.13 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.03	n.d.
	82 $\pm$ 3	78 $\pm$ 6	94 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3
<i>Bailén</i>	1.36 $\pm$ 0.08	1.43 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.07	n.d.
	80 $\pm$ 4	78 $\pm$ 2	96 $\pm$ 7	88 $\pm$ 4
<i>Lucena</i>	0.96 $\pm$ 0.03	n.d.	1.15 $\pm$ 0.1	0.41 $\pm$ 0.06
	83 $\pm$ 2	81	94 $\pm$ 7	87 $\pm$ 2
<i>Mengíbar</i>	1.6 $\pm$ 0.1	0.85 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.05
	81 $\pm$ 5	80 $\pm$ 2	92 $\pm$ 6	89 $\pm$ 6
<b>WWTP Influent<sup>b</sup></b>				
<i>Linares</i>	0.26 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.002	n.d.	n.d.
	85 $\pm$ 6	80 $\pm$ 1	94 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4
<i>Bailén</i>	0.35 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.002	0.25 $\pm$ 0.02	n.d.
	88 $\pm$ 7	81 $\pm$ 1	93 $\pm$ 7	89 $\pm$ 1
<i>Lucena</i>	0.36 $\pm$ 0.02	n.d.	n.d.	n.d.
	87 $\pm$ 6	78 $\pm$ 2	91 $\pm$ 3	89 $\pm$ 1
<i>Mengíbar</i>	0.26 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.002	n.d.	n.d.
	85 $\pm$ 1	82 $\pm$ 1	94 $\pm$ 2	90 $\pm$ 3
<b>River Water<sup>b</sup></b>				
<i>Guadalquivir</i>	0.1 $\pm$ 0.008	n.d.	n.d.	n.d.
	85 $\pm$ 6	82 $\pm$ 2	95 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1
<i>Rabanales</i>	0.32 $\pm$ 0.02	n.d.	n.d.	n.d.
	81 $\pm$ 5	79 $\pm$ 5	92 $\pm$ 2	89 $\pm$ 3
<i>Dos Torres</i>	0.25 $\pm$ 0.01	n.d.	n.d.	n.d.
	81 $\pm$ 3	81 $\pm$ 3	90 $\pm$ 4	88 $\pm$ 2
<sup>a</sup> Spiked Sample (1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>b</sup> Spiked Sample (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ). nd: non detected				





**Figure 2.** LC–fluorescence chromatograms obtained from (A) a standard solution and (B) an influent wastewater sample (Mengíbar’s WWTP in Jaén, Spain); (C) an effluent wastewater sample (Mengíbar’s WWTP in Córdoba, Spain) and (D) a river water sample (Guadalquivir, flowing by Córdoba, Spain). Experimental conditions described in section 2.4.2.

## 4. CONCLUSIONS

Coacervates of reverse micelles of decanoic acid have proven to be a valuable tool for the simultaneous extraction of bisphenols and their diglycidyl ethers from wastewater and river water samples. The general equation proposed for the estimation of the coacervate volume as a function of its components permitted the accurate prediction of the maximum concentration factor that can be reached under given experimental conditions. The procedure is robust (extractions are no dependent on the

ionic strength, temperature or matrix components), simple (treatment of samples only require the extraction of bisphenols for 5min and no clean-up of extracts or solvent evaporation are necessary) and rapid (each complete extraction procedure takes about 15–20 min and several samples can be simultaneously extracted, so sample throughput will be dependent mainly on the chromatographic analysis of the target compounds). There are additional assets associated to the method here developed; it requires low volume sample (around 10mL wastewater or river sample), features low cost (no special equipment is required for extraction and uses fluorimetry for detection, so the method can be applied in routine analysis in labs without extra investment), and achieves actual concentration factors in the range 87–102 for the target compounds, which results in practical detection limits around 30–35 ng L<sup>-1</sup>. Thus, the method developed constitutes a good tool for the study of the fate and distribution of bisphenols and their diglycidyl ether in aquatic environments and it is valuable for their control at the levels perby the European Directives for organic pollutants in waters (100 ng L<sup>-1</sup>).

### **ACKNOWLEDGMENT**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MCyT (Project CTQ2005-00643). They also thank the personnel from the following municipal WWTPs for kindly collecting the sewage water samples: Linares, Bailén, Lucena and Mengíbar. A. Ballesteros-Gómez acknowledges to the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (AP2005-4275).

### **REFERENCES**

- [1] W.F. Smith, Foundations of Materials Science and Engineering, fourth ed., McGraw-Hill, New York, 2005.
- [2] P. Perez, R. Pulgar, F. Olea-Serrano, M. Villalobos, A. Rivas, M. Metzler, V. Pedraza, N. Olea, Environ Health Perspect 106 (1998) 167.

- [3] O.C. Dermer, A. Bisphenol, in: J.J. McKelta (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*, Marcel Dekker, New York, 1983, pp. 406–430.
- [4] M. Del Olmo, A. Zafra, N.A. Navas, J.L. Vílchez, *Analyst* 124 (1999) 385.
- [5] K. Inoue, Y. Yoshie, S. Kondo, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, J. *Chromatogr. A* 946 (2002) 291.
- [6] H. Fromme, T. Kùchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller, A. Wenzel, *Water Res.* 36 (2002) 1429.
- [7] B. Stachel, U. Ehrhorn, O. Heemken, P. Lepom, H. Reincke, G. Sawal, N. Theobald, *Environ. Poll.* 124 (2003) 497.
- [8] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, J. *Chromatogr. A* 1022 (2004) 179.
- [9] Y. Watabe, T. Kondo, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka, K. Hosoya, J. *Chromatogr. A* 1032 (2004) 45.
- [10] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, J. *Chromatogr. A* 1045 (2004) 85.
- [11] C.A. Staples, P.B. Dorn, G.M. Klecka, S.T. Oíblock, L.R. Harris, *Chemosphere* 36 (1998) 2149.
- [12] J.A. Brotons, M.F. Olea, M. Villalobos, V. Pedraza, N. Olea, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 608.
- [13] European Commission, editor, *Technical guidance documents in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances*, Brussels, 1998.
- [14] K. Press-Kristensen, A. Ledin, J.E. Schmidt, M. Henze, *Sci. Total Environ.* 373 (2007) 122.
- [15] A. Tabata, S. Kashiwada, Y. Ohnishi, H. Ishikawa, N. Miyamoto, M. Itoh, Y. Magara, *Water Sci. Technol.* 43 (2001) 109.
- [16] ECOTOX database, US Environmental Protection Agency, 2005, <http://www.epa.gov/ecotox/>.

- [17] M. Chen, M. Ike, M. Fujita, *Environ. Toxicol.* 17 (2002) 80–86.
- [18] K. Satoh, K. Ohyama, N. Aoki, M. Iida, F. Nagai, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 983.
- [19] G. Ramiro, I. Valverde, J. Lago, J. Vleitas, A. Cabado, *Arch. Toxicol.* 80 (2006) 748.
- [20] RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances), National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), STN Database, Chemical Abstract Service, Columbus, OH, 1966.
- [21] R. Urbatzka, A. van Cauwenberge, S. Maggioni, L. Vigano, A. Mandich, E. Benfenati, I. Lutz, W. Kloas, *Chemosphere* 67 (2007) 1080.
- [22] R. Cespedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 992.
- [23] M. Choi, S. Lee, J. Koo, H. Moon, G. Kim, *J. Fisheries Sci. Tech.* 8 (2005) 220.
- [24] M. Kawaguchi, I. Migaku, R. Ito, N. Endo, N. Okanouchi, N. Sakui, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatog. A* 1110 (2006) 1.
- [25] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *J. Chromatog B: Anal. Tech. Biomed. Life Sci.* 805 (2004) 41.
- [26] J.L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. Del Olmo, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 31.
- [27] IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972) 611.
- [28] B. Gander, M.J. Blanco-Prieto, C. Thomasin, Ch. Wandrey, D. Hunkeler, Coacervation/phase separation, in: J. Swarbrick, Boylan F J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [29] H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 28 (1977) 252.

- [30] R. Carabias-Martinez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavon, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [31] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993)133.
- [32] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.
- [33] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*71 (1999) 4519.
- [34] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.
- [35] F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.
- [36] F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, Web release date: 1 September 2007.
- [37] N.R. Draper, H. Smith, *Applied Regression Analysis*, third ed., Wiley-Interscience, New York, 1998, 505–553.
- [38] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemicals, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999.
- [39] SANCO/3103/2000, Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, second ed., 1999/2000.
- [40] D. Barceló, *Environmental Analysis, Techniques Applications Quality Assurance*, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 149–180.
- [41] G.W. Snedecor, W.G. Cochran, *Statistical Methods*, eighth ed., Iowa State University Press, 1989.
- [42] Council Directive 98/83/CE, of 3 November 1998, on the quality of water intended for human consumption (DOCE no. L 330, of 5 December 1998).

# Capítulo 2

---

*Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry*

---



---

**Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry\***

---

**ABSTRACT**

The US Environmental Protection Agency (EPA) and the European Union (EU) have set restrictive limits for priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (CPAHs) in surface waters (EPA 3.8 ng L<sup>-1</sup> and EU 2-100 ng L<sup>-1</sup>) in order to protect aquatic life and human health. Currently, methods meeting these sensitivity criteria are not suitable for routine analysis of CPAHs. Here, we present a simple, rapid and low-cost method for the routine monitorization of these pollutants in aquatic environments based on their extraction with coacervates of decanoic acid reverse micelles in the nano and microscale, and determination by liquid chromatography-fluorimetry (LC-FL). The method involves the stirring of filtered aqueous samples (36 mL) with 4 mL of THF containing 70 mg of decanoic acid for 5 min, its centrifugation for 10 min and the analysis of 20 µL of the resulting coacervate containing the CPAHs by LC/FL. The method is robust, the extractions being independent on salt concentration (up to 1M), temperature (up to 60 °C) and pH (below 4). Besides, the coacervate prevents the CPAHs from adsorption onto the surface of containers during sample storage. No clean-up steps are necessary and the method is matrix-independent. The quantification and detection limits of the method ranged between 0.4 and 3.5

**\*A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito  
*J. Chromatogr. A, 1203 (2008) 168-176***



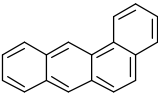
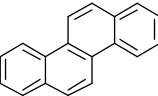
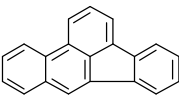
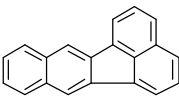
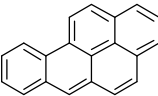
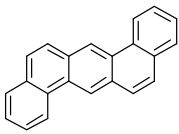
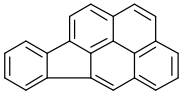
ng L<sup>-1</sup> and 0.1 and 1 ng L<sup>-1</sup> respectively, for the seven priority CPAHs. The method has been successfully applied to the determination of these pollutants in raw and treated sewage from three mechanical-biological treatment plants, two rivers and a reservoir with frequent motorized recreational craft activities, all of them located in the South of Spain. Recoveries for spiked samples in the range 2-30 ng L<sup>-1</sup> were between 88% and 95% with relative standard deviations from 1 to 7%. CPAHs were present in wastewater influents at concentrations in the range 3.9-37 ng L<sup>-1</sup> while the treatment at the WWTPs studied reduced their concentration in their respective effluents in a percentage near 100%. Three CPAHs were present at quantifiable levels in Guadajoz river (1.8-6.6 ngL<sup>-1</sup>) and six in La Breña reservoir (1.39-4.8 ng L<sup>-1</sup>).

## **1. INTRODUCTION**

---

Among the large number of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) polluting the aquatic environments, the group of carcinogenic PAHs (CPAHs) stands out because of its great environmental and health concern. The US Environmental Protection Agency (EPA) has included seven CPAHs in the priority pollutant list and it has recommended a limit of 3.8 ng L<sup>-1</sup> in surface waters as a criterion for water quality [1]. Table 1 gives the structures, octanol-water constants (log K<sub>ow</sub>) and estimated carcinogenic potency of CPAHs according to the classification of the International Agency for Research on Cancer (IARC) [2]. The European Union (EU) has fixed environmental quality standards in surface waters for some of the CPAHs [3,4]. These standards are expressed as a maximum allowable concentration (benzo(a)pyrene, BaP, 100 ng/L) or as an annual average concentration (BaP, 50 ng/L; the sum of benzo(b)fluoranthene, BbF, and benzo(k)fluoranthene, BkF, 30 ng/L; and the sum of indeno(1,2,3-cd)pyrene, IP, and benzo(g,h,i)perylene, BP, 2 ng/L, the latter being not considered carcinogenic by IARC).

**Table 1. Priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: Structures, octanol:water partition coefficients and estimated carcinogenic potency**

PAH	Structure	Log $K_{ow}$ <sup>a</sup>	Carcinogenic Potency <sup>b</sup>
Benzo(a)anthracene, BaA		5.91	2B
Chrysene, Chry		5.91	2B
Benzo(b)fluoranthene, BbF		6.40	2B
Benzo(k)fluoranthene, BkF		6.40	2B
Benzo(a)pyrene, BaP		6.40	1
Dibenzo(a,h) anthracene, DahAn		7.14	2A
Indeno(1,2,3-cd)pyrene, IP		6.89	2B

<sup>a</sup> Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V9.04 for Solaris. <sup>b</sup> IARC classification: carcinogenic to humans (1), probably carcinogenic to humans (2A), possibly carcinogenic to humans (2B)

The routine quantitation of CPAHs in surface waters at the low levels fixed by the EPA and EU requires the development of analytical methods that both provide very efficient extraction and concentration steps and permit their simple, rapid and low cost determination. To our knowledge, no specific methods have been reported for the determination of CPAHs,

although they have been routinely determined along with other PAHs by liquid chromatography and fluorescence (LC-FL) [5-7] or ultraviolet (LC-UV) [7] detection. Gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) has also been employed [8-10]. LC-MS is used to a lesser extent because of the difficulty in ionizing and fragmenting PAHs employing atmospheric pressure ionisation (API)-MS techniques [11,12], which results in detection limits higher than those required for quantification of CPAHs in aquatic environments, even after applying sample treatments that achieve concentration factors of 1000 [13]. LC-FL/UV is the technique used by EPA methods for the analysis of priority PAHs, including CPAHs, in drinking waters (methods 550 and 500.1), wastewaters (method 610) and ground waters (methods 8100 and 8310), but the quantitation limits of these methods ( $0.1\text{-}1.2\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) are well above the quality standards set for CPAHs.

Most of the problems associated with the determination of CPAHs in surface waters are derived from their low concentration. As a result, sample treatment constitutes the bottleneck of the reported analytical methods. The most common extraction methods for CPAHs are solid phase extraction (SPE) [14] and liquid-liquid extraction (LLE) [10], both of them giving recoveries above 70%. However, these methods present major drawbacks, such as the large sample volume necessary (1-50 L), the high consumption of hazardous organic solvents in LLE, the irreversible adsorption in SPE and the laborious evaporation and clean-up steps required. Many of these problems have been overcome with the use of solid-phase microextraction (SPME) [15] and stir bar sorptive extraction (SBSE) [16] which have achieved quantification limits for CPAHs in the ranges  $0.20\text{-}0.98\ \text{ng L}^{-1}$  [15] and  $0.7\text{-}4.9\ \text{ng L}^{-1}$  [16] when combined with GC-MS/MS and LC-FL, respectively. These techniques allow a considerable reduction in the volume of sample treated (10-20 mL) and do not require the use of clean-up steps, however some important drawbacks still remain. Thus, extraction times are too long (60-120 min) and recoveries are affected by CPAH concentration (e.g. they were 60.5 and 91.2% for 5 and 50  $\text{ng L}^{-1}$  of IP, respectively) [16]

and sample matrix (e.g. recoveries for IP ranged between 59 and 95% for superficial and tap water, respectively) [15].

An important factor to consider in the development of an extraction method for CPAHs is their strong adsorption onto the surface of containers [5,17,18], which is a consequence of their high hydrophobicity (see log  $K_{ow}$  in Table 1) and results in considerable losses of these pollutants during storage of samples (e.g. around 15% in 24 h and 30% in 96 h for  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  of BaP in glass containers) [5]. The adsorption can be prevented by the addition to the sample of an organic solvent (e.g. acetonitrile, isopropanol or methanol) in percentages between 20 and 40% v/v [17,19,20], but its effect on the extraction recovery of techniques such as SPE, SPME and SBSE should be always checked. Surfactant aggregates have also been proposed for the preservation of CPAHs in aqueous samples on account of their high stabilizing capacity for the solubilized analytes [5,17,21,22].

In this work, coacervates made up of decanoic acid reverse micelles are proposed for both the microextraction and preservation of CPAHs prior to LC/FL determination at the levels set by the EPA and EU as quality standards for surface waters. Coacervates are water immiscible liquids that separate from colloidal solutions by the action of a dehydrating agent (e.g. changes in temperature or pH of the solution, or addition of an electrolyte or a non-solvent for the macromolecule) [23,24]. They have long been used in analytical extractions where the approach has been named cloud point technique [25-27]. The aqueous sample solution is made colloidal by the addition of surfactants at concentrations above their critical aggregation concentration. So the coacervate, that is the extractant, is produced in situ in the bulk sample solution. A major feature of coacervates is the high concentration of amphiphiles, and therefore of binding sites, they contain (typically  $0.1\text{-}1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ). Consequently, high extraction efficiencies can be achieved using low coacervate volumes which results in high concentration factors (typically 100-500).

Coacervates made up of Triton X-114 [28] and sodium dodecane sulphonic acid (SDSA) [5] micelles have previously been proposed for the

extraction of PAHs from environmental samples, however the quantitation limits for CPAHs ( $0.5\text{-}20\text{ ng L}^{-1}$ ) are not low enough to meet EPA criteria. In addition, some clean-up steps were required to avoid the coelution of Triton X-114 with CPAHs during chromatographic separation [28], while strong acidic conditions were required for the coacervation of SDSA (4M of HCl) [5].

Coacervates consisting of reverse micelles of alkyl carboxylic acids, recently proposed by our research group [29], have the potential to effectively extract and concentrate CPAHs on account of the suitability of reverse micelles to solubilize hydrophobic compounds and the low volume of coacervate obtained ( $\sim 1.67\text{ }\mu\text{L mg}^{-1}$ ). Below, parameters affecting extraction efficiency and concentration factors are optimized and the method is applied to the determination of CPAHs in wastewater and surface waters.

## **2. EXPERIMENTAL**

---

### **2.1. Chemicals**

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid (capric) was obtained from Fluka (Madrid, Spain). Tetrahydrofuran (THF) and LC-grade acetonitrile were supplied by Panreac (Sevilla, Spain) and ultra-high-quality water was prepared with a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). The target compounds chrysene (Chry), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenzo(a,h)anthracene (DahAn) and indeno (1,2,3-cd)pyrene (IP) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), while benzo(a)anthracene (BaA) and benzo(k)fluoranthene (BkF) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Stock standard solutions containing individual CPAHS at a concentration of  $100\text{ mg L}^{-1}$  were prepared in acetonitrile and stored under dark conditions at  $4^{\circ}\text{C}$ . Working solutions containing a mixture of CPAHs were made by appropriate dilutions of the stock solutions with acetonitrile.

## **2.2. Apparatus**

The liquid chromatographic system used (Spectra System SCM1000, ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisted of a P2000 binary pump, a UV1000 detector and a FL3000 fluorescence detector. In all experiments a PEEK Rheodyne 7125NS injection valve with a 20  $\mu$ L sample loop was used (ThermoQuest, San Jose, CA, USA). The stationary-phase column was a Supelcosil TM LC-PAH (5 $\mu$ m, 25 cm). A Mixtasel Selecta centrifuge (Barcelona, Spain) was used for sample preparation.

## **2.3. Determination of CPAHs in surface and wastewater samples**

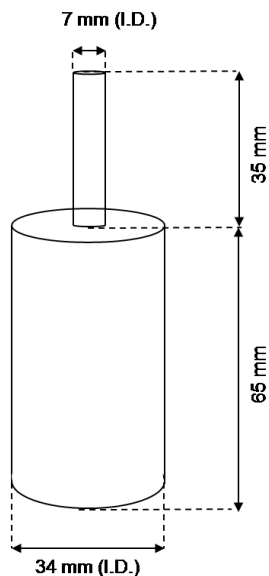
### **2.3.1. Sample collection and preservation**

Wastewater samples were collected in dark glass containers in February 2008 from different municipal wastewater treatment plants (WWTPs) (Lucena, Mengíbar and Arahal) in the South of Spain. Lucena WWTP receives an estimated industrial percentage of the total wastewater input of 40-50% (from the furniture and bronze factories) while those from Mengíbar and Arahal receive mainly domestic influents. Surface waters were collected from the rivers Guadalquivir and Guadajoz and the reservoir La Breña, all of them located in the South of Spain. Samples were transported to the lab and immediately filtered through 0.45  $\mu$ m filters (Watman GF/F Osmonics, France) in order to remove suspended solids. Then, they were adjusted to pH 2 by the addition of concentrated nitric acid. Aliquots of 36mL were transferred to specially designed centrifuge tubes with a narrow neck (Figure 1), which contained 70 mg of decanoic acid dissolved in 4 mL of THF. The tubes were wrapped with aluminium foil to prevent the photodegradation of CPAHs and sealed with parafilm to avoid THF evaporation. The resulting solution, in which the coacervate formed instantaneously, was either subject to coacervative extraction as specified below or mechanically homogenized and stored at room temperature (20-25 °C) when immediate extraction was

not possible. Under these conditions, samples were stable for at least 1 month.

### 2.3.2. Coacervative Extraction

The mixture of water sample, THF and decanoic acid, was stirred (700 rpm, 5 min) and then centrifuged (1850 g, 10 min) to speed up the complete separation of the coacervate. The volume of the coacervate (~115  $\mu\text{L}$ ), which was standing at the top of the solution in the narrow neck of the tube, was calculated by measuring its height with a digital calliper. Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  were withdrawn using a microsyringe and directly injected into the LC-FL system for CPAHs analysis. At this point, as immediate CPAHs analysis was not possible, a volume of coacervate (~100  $\mu\text{L}$ ) was transferred to a sealed amber glass vial with insert (~150  $\mu\text{L}$  capacity) at 4°C and analysed within 7 days.



**Figure 1. Schematic picture of the glass centrifuge tube designed for coacervative extractions**

### 2.3.3. Liquid chromatography/ Fluorescence detection

Separation and quantification of CPAHs was carried out by liquid chromatography-fluorimetry. Water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) were used as eluent solvents at a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The gradient elution program selected was 75% B during the first 5 min, from 75% to 100% B in the next 30 minutes and from 100 to 75% for 5 min for reconditioning of the column. The fluorescence detection was performed at the following excitation and emission wavelengths: Chry and BaA ( $\lambda_{\text{ex}}$  266 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  384 nm), BbF, BkF and BaP ( $\lambda_{\text{ex}}$  284<sub>n</sub> nm,  $\lambda_{\text{em}}$  404 nm), DahAn ( $\lambda_{\text{ex}}$  260 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm) and IP ( $\lambda_{\text{ex}}$  284 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  496 nm). Quantification was

carried out by measuring the chromatographic peak areas of CPAH standard solutions in acetonitrile in the following concentration ranges: BkF and BaP (0.1-500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), BaA, Chry and BbF, (0.2-500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), DahA (0.4-500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and IP (1-500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

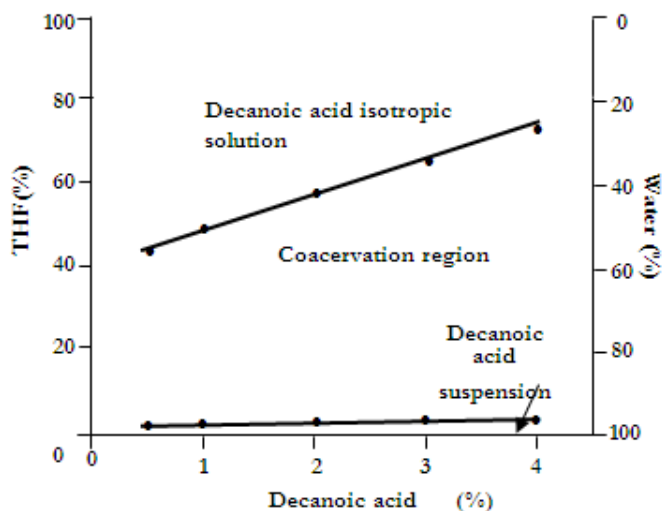
## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Coacervative extraction of CPAHs

### 3.2. Formation and structure of decanoic acid reverse micelle-based coacervates

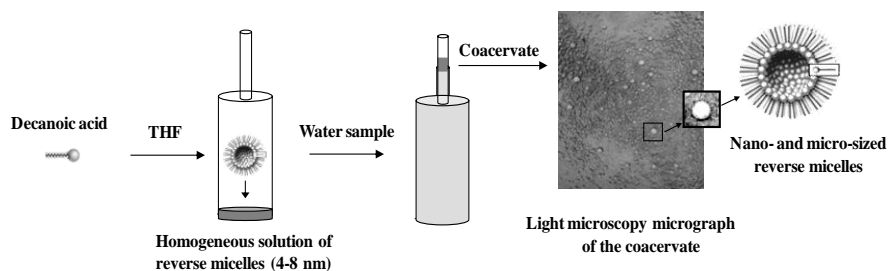
Decanoic acid ( $\text{pK}_a = 4.8 \pm 0.2$ ) is sparingly soluble in water (e.g.  $\sim 0.2 \text{ g L}^{-1}$ ), while it dissolves well in THF and self-assembles as reverse micelles having 4-8 nm diameter according to a sequential-type self-association model [29,30]. When water (pH 1-4) is added to these solutions, reverse micelles result partially desolvated and micelle-micelle interactions becomes easier, which leads to the formation of larger reverse micelles (sizes in the range nm- $\mu\text{m}$ ) that separate as an immiscible liquid from the bulk solution and produce the coacervate. At a microscopic level, the coacervate consists of spherical droplets of different sizes dispersed in a water:THF continuous phase. The water content is only about  $\sim 1\text{-}2\%$ , and it is expected to be either in the micellar core or mixed with THF in the continuous phase. The excellent solvation properties of reverse micelles and the low volume of the coacervates obtained (e.g.  $1.67 \mu\text{L mg}^{-1}$  when using 10% THF) make them very attractive for analytical extractions. Since the coacervation phenomenon occurs from protonated decanoic acid, extractions must be carried out below pH 4.





**Figure 2. Phase diagram of decanoic acid in binary mixtures of THF:water**

Figure 2 depicts the region at which coacervation is produced as a function of the relative concentration of the three coacervate components (THF, water and decanoic acid). Below and above the boundaries of this region, the decanoic acid precipitates or solubilizes in the THF:water mixture, respectively. This type of phase diagram has been previously observed for the coacervation of phospholipid [31,32] and gelatine [33] in miscible water/alcohol binary mixtures and it is very different to those obtained from surfactants in immiscible solvents binary mixtures [34,35]. Figure 3 shows a picture of the surfactant aggregates present in the different steps of the extraction process. The driving forces for the extraction of CPAHs in the decanoic acid reverse micelles are mainly hydrophobic and consequently the more probable solubilization site is the surfactant tails at the micellar surface.



**Figure 3. Illustration of the different surfactant aggregates involved in the coacervative extraction**

### 3.3. Optimisation

Optimal conditions for the extraction of CPAHs were investigated by changing each variable in turn while keeping the others constant. Actual concentration factors (ACFs), calculated from recoveries (Rs) and phase volume ratios (sample volume/coacervate volume; PVRs), were used as a criterion for the selection of the experimental conditions. In order to meet the restrictive water quality criteria set by EPA for CPAHs ( $3.8 \text{ ng L}^{-1}$ ) and taking into account the instrumental quantitation limits of fluorescence detection for these compounds ( $0.1\text{-}1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ), ACFs around 280 should be achieved. So, conditions giving these ACF value were selected provided that recoveries were above 70% and relative standard deviations were below 10%, as it has been recommended for the determination of pollutants in environmental samples [36-38].

Phase volume ratios (PVRs) depended on both the decanoic acid amount and THF concentration, linearly and exponentially, respectively. Water hardly incorporated to the extractant phase due to its non-solvent character for the reverse micelles. For the optimisation process, PVRs were estimated from a general equation previously reported for the prediction of the volume of the coacervate made up of decanoic acid as a function of its major components (THF and decanoic acid) [39]. The equation was  $y = 1.035 \text{ }\mu\text{L mg}^{-1} a e^{0.0473b}$ , where  $y$  was the volume of coacervate in  $\mu\text{L}$ ,  $a$  the amount of decanoic in mg

and  $b$  the THF in percentage (v/v). The correlation coefficient for this equation, fitted by nonlinear regression, was 0.995, thus indicating its high capability of prediction.

Recoveries were investigated as a function of the amount of decanoic acid (20-400 mg), percentage of THF (2.5-30%, v/v), pH (1-4), salt concentration (10<sup>-3</sup>-1M NaCl), temperature (25-60 °C) and extraction time (0-30 min, at 700 rpm with a magnetic bar). Experiments were made in triplicate. Distilled water was spiked at two CPAHs concentration levels depending on the PVRs estimated, namely 10 and 50 ng L<sup>-1</sup> for PVRs above and below 250, respectively. The final volume of the solution (distilled water + THF) was 40 mL.

Table 2 shows the results obtained for recoveries and ACFs as a function of the amount of decanoic acid. Because of their high hydrophobicity (see log Kow in Table 1), CPAHs behaved similarly with regard to extraction. Recoveries around 90% were obtained for all the target compounds at decanoic acid amounts as low as 60 mg. The recovery was quantitative as the amount of decanoic acid was about 400 mg but the volume of coacervate, which is linearly dependent on this component, increased too much and the corresponding ACFs did not meet the EPA water quality criteria for CPAHs. Standard deviations were always low enough and they were not considered for the selection of this variable. An amount of decanoic acid of 70 mg was selected for further experiments on account of the scarce dependence of recoveries on decanoic acid in the range 60-80 mg and the ACFs obtained.

The influence of the concentration of THF on the recoveries and ACFs is given in Table 3. Recoveries progressively increased as the percentage of THF did and then they decreased at the highest concentration investigated. This behaviour was related to the composition of the coacervate as a function of the THF percentage. Thus, according to previous results [29], maximal transfer of decanoic acid from the bulk solution to the coacervate occurs at THF concentrations around 10%. Above this concentration, the amount of decanoic acid in the coacervate keeps constant while the amount

of THF exponentially increases until a maximum at which the coacervate starts to dissolve.

**Table 2. Mean percent recoveries along with their standard deviations ( $R \pm SD$ , %) and actual concentration factors (ACF) obtained for CPAHs as a function of the amount of decanoic acid**

CPAH		Decanoic acid (mg)						
		20	40	60	70	80	200	400
<b>BaA</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	56±2	65±3	88±1	91±3	92±2	94±3	98±1
	ACF	607	353	318	282	249	102	53
<b>Chry</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	56±3	65±1	87±4	91±1	93±2	95±2	97±1
	ACF	607	353	314	282	252	103	53
<b>BbF</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	54±1	66±5	87±2	92±3	92±2	96±4	99±4
	ACF	585	358	314	285	249	104	54
<b>BkF</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	54±3	64±4	89±4	93±2	92±3	96±2	98±5
	ACF	585	348	322	288	249	104	53
<b>BaPy</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	54±4	64±2	88±1	93±3	91±3	95±6	98±2
	ACF	585	348	318	288	247	103	53
<b>DahAn</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	53±2	63±1	89±2	91±4	92±2	95±3	97±2
	ACF	574	342	322	282	249	103	53
<b>IP</b>	<sup>a</sup> $R \pm SD$	51±1	62±1	87±1	92±2	93±4	97±2	99±5
	ACF	553	342	314	285	252	105	54

Spiking levels: <sup>a</sup> 10 ng L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> 50 ng L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> n = 3; THF =10 %

**Table 3. Mean percent recoveries and standard deviations (R ± SD, %), and actual concentration factors (ACFs) obtained for CPAHs as a function of tetrahydrofuran concentration**

CPAH		THF (% v/v)				
		2.5	5	10	20	30
<b>BaA</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	82±1	84±3	91±3	99±6	74±5
	ACF	392	348	282	170	69
<b>Chry</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	85±2	84±2	93±6	97±5	72±4
	ACF	406	348	288	166	67
<b>BbF</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	83±1	84±4	93±4	100±6	76±4
	ACF	397	348	288	172	71
<b>BkF</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	85±5	86±4	93±4	102±5	80±4
	ACF	406	356	288	175	75
<b>BaPy</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	85±3	89±1	92±4	100±3	76±5
	ACF	406	368	285	172	71
<b>DahAn</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	83±2	87±1	92±5	100±2	80±6
	ACF	397	360	285	172	75
<b>IP</b>	<sup>a</sup> R± <sup>c</sup> SD	85±4	89±1	92±3	99±4	79±6
	ACF	406	368	285	170	74

Spiking levels: <sup>a</sup> 10 ng L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> 50 ng L<sup>-1</sup>; c n= 3; decanoic acid= 70 mg

### ***3.4. Study of the adsorption of CPAHs onto the surface of glass containers under different preservation conditions***

The extent of adsorption of CPAHs onto the surface of amber glass containers was assessed using spiked wastewater influent samples, previously filtered and adjusted to pH 2 with concentrated nitric acid, and subjected to different preservation conditions. Firstly, adsorption was investigated in samples stored at 4°C, with no additives, for a period of 7 days. Aliquots of these samples were directly analysed by LC/FL, so the spiked concentrations

( $2 \mu\text{g L}^{-1}$  for each CPAH except for IP,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were selected to be able to assess until at least a percentage of adsorption around 80%. Experiments were made in triplicate. Table 4 shows some representative results. CPAHs were rapidly adsorbed onto the glass surface at the start, the adsorption being higher as the hydrophobicity of the target compounds increased (see octanol-water constants in Table 1). The adsorption was progressively increasing and it was in the range 64-80% after 7 days of sample storage. The addition of THF at the concentration required to produce the coacervate, 10%, did not avoid adsorption but it was lower than without additives, especially for the less hydrophobic compounds (see Table 4).

CPAH	Percentage of adsorption (%) $\pm$ <sup>a</sup> standard deviation							
	Without additives				Addition of 10% THF			
	4 h	24 h	48 h	168 h	4 h	24 h	48 h	168 h <sup>b</sup>
<b>BaA</b>	25 $\pm$ 1	33 $\pm$ 2	52 $\pm$ 3	69 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1
<b>Chry</b>	26 $\pm$ 1	35 $\pm$ 2	51 $\pm$ 2	64 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1	27 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2
<b>BbF</b>	30 $\pm$ 1	44 $\pm$ 2	60 $\pm$ 3	65 $\pm$ 5	32 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1	50 $\pm$ 4	51 $\pm$ 3
<b>BkF</b>	27 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2	61 $\pm$ 4	64 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	40 $\pm$ 2	49 $\pm$ 3	49 $\pm$ 2
<b>BaPy</b>	30 $\pm$ 3	50 $\pm$ 1	63 $\pm$ 5	69 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	50 $\pm$ 5	55 $\pm$ 2	56 $\pm$ 4
<b>DahAn</b>	35 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4	60 $\pm$ 3	80 $\pm$ 4	34 $\pm$ 2	55 $\pm$ 4	65 $\pm$ 2	65 $\pm$ 4
<b>IP</b>	38 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1	60 $\pm$ 3	80 $\pm$ 4	37 $\pm$ 2	58 $\pm$ 3	65 $\pm$ 2	64 $\pm$ 4

<sup>a</sup>n= 3; influent sample spiked with  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (except for IP,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ); storage conditions: 4°C, dark

At this point, we studied the capacity of decanoic acid reverse micelle-based coacervates for desorption of CPAHs from the surface of glass containers for samples stored at pH 2 without additives. With this aim filtered wastewater influent samples (36 mL, pH 2), were spiked with  $30 \text{ ng L}^{-1}$  of each CPAH and stored during 24 or 48h in specially designed centrifuge tubes (4°C, in the dark). Then, they were subjected to coacervative extraction by adding 70 mg of decanoic acid dissolved in 4mL of THF.

Extractions were carried out by stirring the samples (700 rpm) at 10-min intervals and then centrifuged at 1850 g for 10min. Aliquots of the extracts (20  $\mu\text{L}$ ) were analysed by LC-FL. According to the results, the coacervate was able to recover the previously adsorbed CPAHs, but the time required for their complete recovery increased as the time of sample storage did. Thus, 40 and 60 min were necessary for quantitative extraction of CPAHs from samples stored without additives (4°C, in the dark) during 24 and 48 h, respectively. So, if this option is selected for sample preservation, the time for coacervative extraction after longer periods of storage should be optimised.

Finally, the suitability of coacervates for the preservation of CPAHs after their collection was assessed. With this purpose, aliquots of wastewater influent samples (36 mL) were filtered and adjusted at pH 2, spiked with 30  $\text{ng L}^{-1}$  of each CPAH and transferred to specially designed centrifuge glass tubes (Fig. 1), that contained 70 mg of decanoic acid dissolved in 4 mL of THF. The tubes were wrapped with aluminium foil to prevent CPAHs from photochemical degradation. As the equilibrium partition of CPAHs between the coacervate and the bulk aqueous solution was rapidly reached after just a mechanical homogenization, the solubilization of CPAHs into the reverse micelles should prevent them from adsorption onto the surface of the glass tubes. To confirm this hypothesis and in order to give working flexibility to labs, two storage conditions were investigated. First, the glass tubes containing the sample and the coacervate were sealed with parafilm to prevent THF evaporation and then they were kept at room temperature (20-25 °C) until analysis. At this point, the sample was centrifuged at 1850 g for 10min and an aliquot of 20  $\mu\text{L}$  was analysed for CPAHs by LC/FL. Secondly, samples were centrifuged and about 100  $\mu\text{L}$  of the coacervate was transferred to sealed amber glass vials with inserts (~150  $\mu\text{L}$  capacity) and stored at 4°C until analysis by LC/FL. In both cases, CPAH analysis was carried out at three-day intervals during one month. The results obtained showed that the coacervate stabilized all the CPAHs for at least 1 month,

independently of the storage conditions, so it constitutes a good tool for preservation of the target compounds.

### **3.5. Analytical performance**

Calibration curves for CPAHs were run using standard solutions prepared in acetonitrile since no differences in peak areas or retention times were observed for the analytes injected in organic solvent or the coacervate. The main analytical characteristic of the method are given in Table 5. The instrumental detection (LODs) and quantification (LOQs) limits were calculated from blank determinations (i.e. bidistilled water extracted similarly to the samples) using a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. The quantification and detection limits of the method were estimated from these values and considering the ACFs obtained. The method LOQs were between 0.4 and 3.5 ngL<sup>-1</sup> for all the CPAHs (see Table 5). Consequently, the method permitted their quantification below the ultra-trace level proposed by EPA as quality standards for CPAHs in surface water (3.8 ngL<sup>-1</sup>). It also allowed to meet the quality standards established by the EU for CPAHs, except for IP, which could be detected but not quantified at the required level (2 ngL<sup>-1</sup>). Under the experimental conditions proposed for their determination, recoveries for CPAHs varied between 88% and 95%, in the whole range of concentrations tested (~1-200 ngL<sup>-1</sup>), with standard deviations in the interval 1-6%.

The possible interference of matrix components that could elute with CPAHs was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves ( $n = 7$ ) obtained from standards in distilled water with those obtained from wastewaters and river water samples, fortified with known amounts of CPAHs, and run using the whole procedure. The slopes of the calibration curves performed in distilled water were 496±10, 737±35, 354±20, 1035±62, 860±50, 380±19, 37±2 mV L ng<sup>-1</sup> for BaA, Chry, BbF, BkF, BaP, DahAn and IP, respectively. The difference between these slopes and those obtained from environmental samples were found to be not statistically significant by



applying an appropriate Student's t test [40]. The calculated t-values were in the range 0.03–1.1 and were below the critical t-value (3.17), being significance established at 0.01 levels. Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of the target compounds.

The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent fortified samples using wastewaters ( $n = 6$ ) and surface waters ( $n = 5$ ). The values expressed as relative standard deviation (R.S.D.), were between 3% and 5% for the seven CPAHs.

**Table 5. Analytical performance of the method**

	Retention time (min)	External calibration			Method <sup>b</sup> LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Method <sup>c</sup> LOD (ng L <sup>-1</sup> )
		Linear range (μg L <sup>-1</sup> )	Slope ±SD [(x10 <sup>3</sup> ) mV L μg <sup>-1</sup> ]	<sup>a</sup> r		
<b>BaA</b>	13.2	0.2-500	1.99±0.03	0.998	0.7	0.3
<b>Chry</b>	14.4	0.2-500	2.96±0.05	0.998	0.7	0.3
<b>BbF</b>	17.7	0.2-500	1.41±0.02	0.998	0.7	0.3
<b>BkF</b>	19.6	0.1-500	4.2±0.06	0.998	0.4	0.1
<b>BaP</b>	21.1	0.1-500	3.46±0.05	0.998	0.4	0.1
<b>DahA</b>	23.4	0.4-500	1.53±0.03	0.998	1.4	0.4
<b>IP</b>	26.3	1-500	0.148±0.007	0.996	3.5	1

<sup>a</sup>correlation coefficient;  $n=7$ ; <sup>b</sup> estimated quantification limits of the method; <sup>c</sup> estimated detection limits of the method.

### 3.6. Analysis of environmental water samples

To prove the suitability of the method to work under real conditions, it was applied to the determination of CPAHs in two rivers, a reservoir and three different WWTPs. Table 6 shows the results obtained, expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. These samples were also spiked with different CPAHs concentrations according to the level of CPAHs found in the samples.

Recoveries obtained ranged between 88% and 95% with relative standard deviations from 1 to 7%.

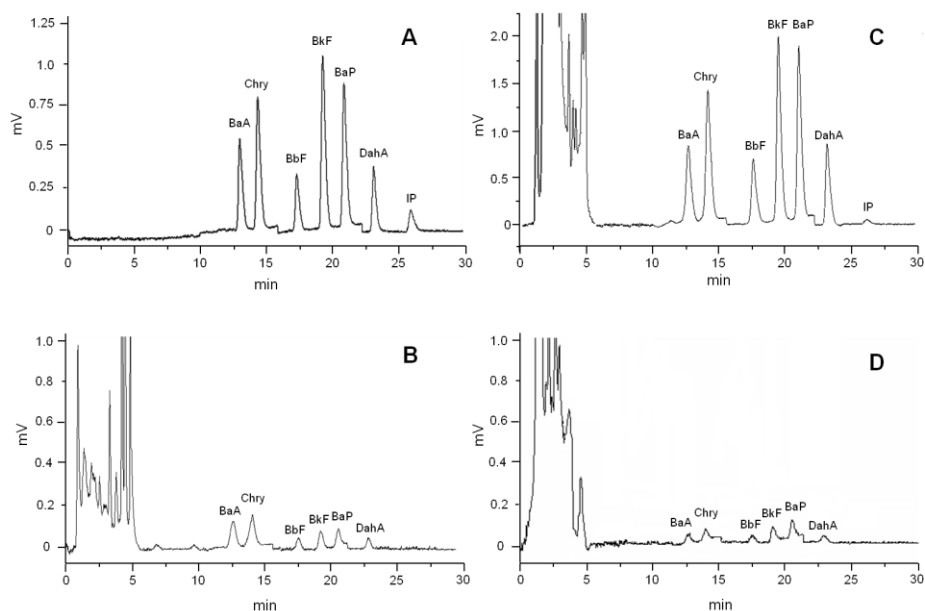
Regarding surface waters, CPAHs were found in some samples at levels near or even higher than the water quality standards recommended by EPA.

<b>Table 6. Mean concentration (ngL<sup>-1</sup>) ±standard deviation (n = 3) of the CPAHs found in wastewater and surface water samples, and recoveries (%) ±standard deviation (n = 3) obtained after spiking the samples with the target analytes</b>							
<b>Sample Location</b>	<b>BaA</b>	<b>Chry</b>	<b>BbF</b>	<b>BkF</b>	<b>BaPy</b>	<b>Da hA</b>	<b>IP</b>
<b>WWTP Influent</b>							
<i>Lucena<sup>a</sup></i>	35±1	34±1	38±1	34±1	35±2	37±2	23±1
	90±4	91±4	90±3	90±4	94±5	93±5	90±4
<i>Mengíbar<sup>b</sup></i>	8.0±0.3	12.4±0.5	9.3±0.6	6.6±0.4	7.1±0.6	8.6±0.5	n.d.
	93±4	96±4	92±6	90±5	92±6	93±6	93±5
<i>Arahal<sup>b</sup></i>	3.9±0.2	5.2±0.4	16.5±0.9	11.4±	4.1±0.1	6.9±0.2	n.d.
	91±5	92±5	92±5	0.4	94±2	94±5	95±4
<b>WWTP Effluent</b>							
<i>Lucena<sup>c</sup></i>	2.11±	1.16±	1.08±	0.77±	1.09±	1.7±0.1	n.d.
	0.05	0.03	0.01	0.03	0.01	90±5	93±5
	92±2	95±2	90±1	94±4	92±1		
<i>Mengíbar<sup>c</sup></i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	90±3	96±2	94±3	92±3	90±4	94±4	93±2
<i>Arahal<sup>c</sup></i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	91±2	93±1	92±1	91±6	92±6	92±7	93±6
<b>Surface water</b>							
<i>Guadalquivir river<sup>c</sup></i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	91±4	89±3	90±2	90±3	95±6	90±6	95±4
<i>Guadajoz river<sup>c</sup></i>	2.5±0.1	3.4±0.2	3.4±0.1	<LOQ	6.6±0.2	1.8±0.1	n.d.
	88±4	89±4	90±2	92±3	95±1	91±3	92±5
<i>La Breña reservoir<sup>c</sup></i>	4.8±0.3	3.2±0.1	2.2±0.1	1.39±	1.46±	2.2±0.1	n.d.
	92±5	92±2	94±6	0.02	0.02	92±5	93±6
				94±2	92±3		
<sup>a</sup> : sample spiked with 30 ng L <sup>-1</sup> ; <sup>b</sup> : sample spiked with 10 ng L <sup>-1</sup> ; <sup>c</sup> : sample spiked with 2 ng L <sup>-1</sup> , except for IP (5 ngL <sup>-1</sup> ); n.d. non detected; <LOQ: detected but below the quantification limit.							

Six CPAHs were present in the river Guadajoz, five of them above the quantification limit and in the range 1.8-6.6 ng L<sup>-1</sup>, while six CPAHs were found at levels between 1.39 and 4.8 ng L<sup>-1</sup> in the reservoir La Breña. The fact that the sampling location in the river Guadajoz was near a divided highway while in river Guadalquivir was at countryside, may explain the difference in the concentrations of analytes in these two rivers. On the other hand, the presence of CPAHs in La Breña was probably due to the frequent aquatic motor activities at this reservoir, exhaust emissions resulting in large amounts of combustion products and unburned fuel being mixed into water [41]. In fact the increasing CPAHs pollution of surface waters by recreational water craft is an issue that demands research [41].

The target compounds, except IP, were present in all influents at concentrations in the range 3.9-37 ng L<sup>-1</sup>, the highest concentrations being found in Lucena WWTP that receives a large percentage (40-50%) of industrial wastewater. The treatment at the WWTPs reduced the levels of CPAHs below their detection limits, being they only present in the Lucena effluent at very low concentrations (below ~2 ng L<sup>-1</sup>).

The chromatograms obtained from a standard solution in acetonitrile (A), La Breña reservoir (B) and Lucena influent (C) and effluent (D) samples are shown in Figure 4. No interference from matrix components were detected for any of the samples analysed.



**Figure 4.** LC/Fluorescence chromatograms obtained from (A) a standard solution in acetonitrile ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of IP and  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  of the rest of CPAHs); (B) a reservoir water sample (La Breña in Córdoba, Spain); and (C) an influent and (D) an effluent wastewater sample from Lucena's WWTP in Córdoba, Spain.

#### 4. CONCLUSIONS

Coacervates of reverse micelles of decanoic acid have been proven to be a valuable tool for the extraction of CPAHs from wastewater and surface water samples prior to their determination by LC/FL. The extraction procedure is robust (extractions are not dependent on the ionic strength, temperature or matrix components), simple (no clean-up of extracts or solvent evaporation are necessary), rapid (extractions require 5 min of stirring and 10 min of centrifugation and several samples can be simultaneously processed), and suitable for the preservation of the analytes during storage of samples (coacervates are able to prevent the adsorption of CPAHs onto the surface of glass containers for at least 1 month). Furthermore, it requires low volume sample (36 mL) and features low cost (no special equipment is

required for extraction, so the method can be applied in labs without extra investment, and uses fluorimetry as detector that is cheaper than MS). The proposed method permits the routine monitorization of these compounds at the thresholds set as quality standards in surface waters by the EPA and the EU. Only IP could not be quantified, although it may be detected, at the level fixed by the EU ( $2 \text{ ng L}^{-1}$ ), owing to its lower fluorimetric sensitivity.

## **ACKNOWLEDGMENT**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MCyT (Project CTQ2005-00643). They also thank the personnel from the following municipal WWTPs for kindly collecting the sewage water samples: Arahál, Lucena and Mengíbar. A. Ballesteros-Gómez acknowledges to the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (AP2005-4275).

## **REFERENCES**

- [1] United States Environmental Protection Agency (USEPA) 2002. National Recommended Water Quality Criteria: 2002. Office of Water, Office of Science and Technology. EPA-822-R-02-047. Available at: <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqcriteria.html>
- [2] 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). Available on: <http://monographs.iarc.fr/ENG/classification/index.php>
- [3] 2006/0129 Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, European Commission, Brussels, 2006.

- [4] 2007/C97/02 Opinion of the European Economic and Social Committee on the Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, Off. J. Eur. Union C97 (2007) 3.
- [5] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29.
- [6] R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras, *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 199.
- [7] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 291.
- [8] R. Gotz, O.H. Bauer, P.Friesel, K. Roch, *Chemosphere* 36 (1998) 2103.
- [9] C. Vogelsang, M. Grung, T. Gunnar Jantsch, K. Erik Tollefsen, H. Liltved, *Wat. Res.*, 40 (2006) 3559.
- [10] T. T. Pham, S. Proulx, *Wat. Res.* 31 (1997) 1887.
- [11] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 100 (2003) 477.
- [12] S. Pérez, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 475.
- [13] M. Takino, S. Daishima, K. Yamaguchi, T. Nakahara, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 53.
- [14] F. Buseti, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer, P. Traverso, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 104.
- [15] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P.López-Mahía, D.Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007) 48.
- [16] M. Bourdat-Deschamps, J.-J. Daudin, E. Barriuso, *J. Chromatogr. A*, 1167 (2007) 143.
- [17] A. López, E. Blanco, J.I. García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 264 (1992) 241.
- [18] L. Wolska, M. rawa-Adkonis, J. Namiiesnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1389.
- [19] R.K. Symons, I. Crick, *Anal. Chim. Acta*, 151 (1983) 237.

- [20] R. El Harrak, M. Callul, R.M. Marcé, F. Borrull, J. High Resolut. Chromatogr. 21 (1998) 667
- [21] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, J. Chromatogr. A 949 (2002) 291.
- [22] E.R. Brower, A.N.J. Herms, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr.A 669 (1994) 45.
- [23] IUPAC Compendium of Chemical Terminology 1972, 31, 611.
- [24] B.Gander, M.J. Blanco-Prieto, C. Thomasin, Ch. Wandrey, D. Hunkeler, Coacervation/Phase Separation, in: J. Sawrbrick, J.C. Boylan (Eds.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [25] W.L. Hinze, E. Pramauro, Crit. Rev. Anal. Chem. 24 (1993) 133.
- [26] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavon, C. García-Pinto, E. Fernández- Laespada, E. J. Chromatogr. A 902 (2000) 251.
- [27] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 470.
- [28] R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras, Anal. Chim. Acta 330 (1996) 199.
- [29] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 79 (2007) 7473.
- [30] J.H. Fendler, Membrane Mimetic Chemistry, New York : John Wiley and Sons, 1982, 223-232.
- [31] F. Ishii, A.Takamura, Y. Ishigami, Langmuir 11 (1995) 483.
- [32] K. Saegusa, F. Ishii, Langmuir 18 (2002) 5984.
- [33] J.R. Nixon, S.A. Khalil, J.E. Carless, J. Pharm. Pharmacol. 18 (1966) 409.
- [34] M.P. Pilene, (Ed.) Structure and Reactivity in Reverse Micelles, Elsevier, New York, 1989
- [35] J.H. Clint, Surfactant Aggregation, Blackie, Glasgow, Scotland, 1992.

- [36] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemicals, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999.
- [37] SANCO/3103/2000, Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, second ed., 1999/2000.
- [38] D. Barceló, Environmental Analysis. Techniques, Applications and Quality Assurance, Ámsterdam: Elsevier, 1993, 149-180.
- [39] A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 603 (2007) 51.
- [40] L. Cuadros-Rodriguez, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, C. Jiménez-Linares, M. Román-Ceba, J. AOAC Int. 78 (1995) 471.
- [41] C. Depree. Potential impacts o emissions from outboard motors on the aquatic environment: a literature review. West Coast Regional Council. National Institute of Water and Atmospheric Research Ltd, Hamilton, New Zealand. NIWA Client Report: HAM2007-026, March 2007. NIWA Project: ELF07201.





# Capítulo 3

---

***Potential of supramolecular solvents  
for the extraction of contaminants in  
liquid foods***

---



---

## Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods\*

---

### ABSTRACT

Amphiphile-based supramolecular solvents (SUPRASs), which are water immiscible liquids consisting of supramolecular aggregates in the nano and micro scale regimes dispersed in a continuous phase, were assessed for the extraction of trace contaminants in liquid foods. The SUPRAS selected was made up of reversed micelles of decanoic dispersed in tetrahydrofuran (THF)-water and the contaminants used as a model were bisphenol A (BPA), ochratoxin A (OTA) and benzo(a)pyrene (BaPy). The influence of matrix components on the extractant solvent production, extraction recoveries and actual concentration factors was investigated by using commercial foods such as wine and wine-based products, beer, soft drinks and tea and coffee brews, and/or aqueous synthetic solutions containing specific food matrix components. The method involved the addition of decanoic acid (80 mg) and THF (0.8-1.7 mL) to the food sample (15 mL), stirring of the mixture for 5 min, centrifugation for 10 min and analysis of 10-20  $\mu\text{L}$  of the extract by liquid chromatography coupled to fluorimetry for OTA and BaPy or to mSUPRAS spectrometry for BPA. No clean-up of the crude extracts was required for any of the samples analysed. The quantification limits for the contaminants (14-31  $\text{ng L}^{-1}$ , 0.37-0.39  $\text{ng L}^{-1}$  and 562-602  $\text{ng L}^{-1}$  for OTA, BaPy and BPA, respectively) were far below their respective European legislative threshold limits Recoveries for food samples were in the ranges 79-93%, 90-96 and 78- 82% for OTA, BaPy and BPA respectively, with

**\*A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito  
*J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 530-539**

relative standard deviations ranging from 1 to 7%, and actual concentrations factors between 65 and 141. The methods developed were applied to the determination of the target compounds in a variety of commercial foods. OTA was found in vinegar, must and beer samples, the concentrations ranging from 92 to 177 ng L<sup>-1</sup>, BaPy was quantified in samples of tea and coffee at concentrations between 1.5 and 16.6 ng L<sup>-1</sup> whereas BPA was detected in two canned soft drinks and quantified in one of them (tea beverage) at a level of 2.3 µg L<sup>-1</sup>.

## **1. INTRODUCTION**

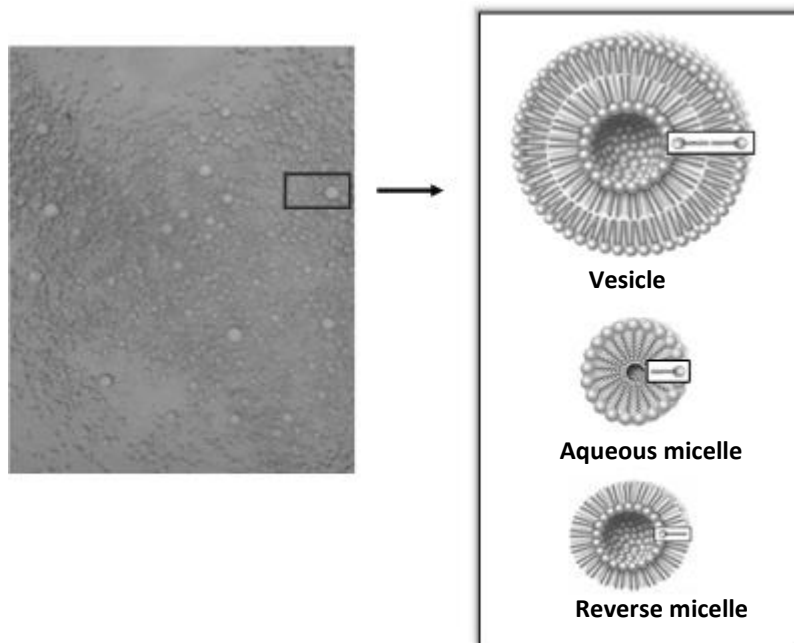
---

Regulatory agencies and quality control laboratories are continuously demanding faster, simpler and cheaper methods for the analysis of trace contaminants in food. Sample preparation is nowadays the bottleneck in food analysis and there is a need to minimize the number of steps in order to reduce both time and sources of error [1]. Furthermore, methods must be sensitive enough to cover the decreasing legislative limits for food contaminants as well as more environmentally friendly.

Solvent extraction is by far the commonest technique used in official [2-4] and recently reported [5-7] methods for the extraction of contaminants from liquid foods, despite it often requires the use of large volumes of toxic organic solvents (typically 50-500 mL) and the subsequent evaporation and clean-up of the extracts. The amount of solvent required can be drastically reduced by using membrane-assisted extraction [8-10] or single-drop microextraction [11] however the suitability of these techniques for the extraction of trace contaminants is still in question because their efficiency is often matrix and analyte dependent [1]. On the other hand, regarding solid-phase extraction techniques, immunosorbents, although expensive and with limited liquid food applications so far, have become a good strategy for the extraction of ochratoxin A in wines [12] and phenylurea herbicides in fruit juices [13,14]. However, on the whole, there is still a strong requirement for

more general and valuable sample preparation procedures that meet the demanding regulatory limits established [1].

This paper evaluates the capability of amphiphile-based supramolecular solvents (SUPRASs) to extract trace contaminants in liquid foods. The term *supramolecular solvent* is here introduced for the first time to design water-immiscible liquids made up of supramolecular assemblies dispersed in a continuous phase. SUPRASs 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 above a critical aggregation concentration, mainly aqueous (size 3-6 nm) and reversed micelles (size 4-8 nm), and vesicles (size 30-500 nm), depending on the structure of the amphiphile and solvent properties. Then, the generated nanostructures self-SUPRASsemble 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, named *coacervation* [15], occurs in many colloidal solutions containing proteins, carbohydrates and polymers and it is widely used for microencapsulation of active ingredients in pharmaceuticals and food [16]. Supramolecular solvents are, by definition, incompatible with the solvent from which they originated despite this solvent is a major component of SUPRASs and constitutes the continuous phase in which the supramolecular assemblies disperse [17]. Likewise supramolecular solvents are reversible; the ordered structures assemble through non-covalent interactions and may disassemble in response to environmental factors or external stimuli, so SUPRASs behave as adaptive materials [18]. Figure 1 shows a typical micrograph of an SUPRAS and depicts the common nanostructures that make it up.



**Figure 1. Light microscopy (bright field) micrograph of a typical amphiphile-based supramolecular solvent, and schematic picture of the aggregates that may constitute it**

The outstanding properties of SUPRASs for extraction processes derive from the special structure and high concentration of the ordered aggregates that constitute them. Supramolecular assemblies have regions of different polarity that provide a variety of interactions for analytes. The type of interaction may be tuned varying the hydrophobic or the polar group of the amphiphile and in theory we may design the most appropriate SUPRAS for a specific application because amphiphiles are ubiquitous in nature and synthetic chemistry. A major feature of SUPRASs is the high concentration of amphiphiles, and therefore of binding sites, they contain (typically  $0.1-1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ). Consequently, high extraction efficiencies can be achieved using low SUPRAS volumes which results in high concentration factors (typically 100-500).

Non-ionic micelle-based supramolecular solvents have been applied to the extraction of contaminants in environmental aqueous samples for a long

time and the corresponding extraction approach has been named *cloud point technique* in the analytical literature [19-21]. The development of supramolecular solvents based on zwitterionic [22], cationic [23] and anionic [24] micelles avoided the problems of coelution caused by non-ionic surfactants in LC and made compatible SUPRASs with MS, which permitted their application to the extraction of pollutants from sludge and soils [25,26]. Recently, SUPRASs made up of vesicles [27] and reversed micelles [28] of alkyl carboxylic acids have been reported and have marked a turning point with regard to the type of aggregates that constitute them, the variety of interactions they can establish with analytes and the high concentration of amphiphiles they contain.

This paper explores for the first time the suitability of SUPRASs for the development of simple, robust and reliable sample preparation methods for the determination of contaminants in liquid foods. For this purpose, bisphenol A (an endocrine disrupter migrating from food packaging materials), ochratoxin A (a carcinogenic mycotoxin) and benzo(a)pyrene (a carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon produced in food processing) were selected as model analytes. The food matrices investigated included wine, vinegar, must, beer, soft drinks and tea and coffee brews. The supramolecular solvent made up of decanoic acid reversed micelles was used as extractant [28]. The selection of this SUPRAS was based on its capacity to bind analytes through hydrophobic and hydrogen bond interactions and its low volume. Liquid chromatography coupled to fluorescence or mass spectrometry was used for the quantitation of the extracted contaminants. The influence of food matrix components on the formation and behaviour of the selected SUPRAS was investigated, the parameters affecting extraction efficiencies and concentration factors were optimized, the analytical characteristics of the developed methods were established and they were successfully applied to the determination of contaminants in a variety of liquid foods.



## **2. EXPERIMENTAL**

---

### **2.1. Chemicals**

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid (capric) was obtained from Fluka (Madrid, Spain). Tetrahydrofuran (THF) and LC-grade acetonitrile were supplied by Panreac (Sevilla, Spain), and ultra-high-quality water was obtained with a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). The target compound bisphenol A [BPA; 2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)propane] was obtained from Fluka while benzo(a)pyrene (BaPy) and Ochratoxin A (OTA) were purchased in Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The biomolecules sucrose, D-(-)-fructose and D-(+)-glucose were acquired from Sigma-Aldrich, and albumin from bovine serum, albumin from chicken egg white and lysozyme from chicken egg were obtained from Fluka. Stock standard solutions of 1 g L<sup>-1</sup> of BPA in acetonitrile, 100 mg L<sup>-1</sup> of BaPy in acetonitrile and 10 mg L<sup>-1</sup> of OTA in methanol, were stored under dark conditions at -20°C. Working solutions were made by appropriate dilutions of the stock solutions with acetonitrile or methanol.

### **2.2. Apparatus**

The liquid chromatographic system used to quantify OTA and BaPy (Spectra System SCM1000, ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisted of a P2000 binary pump and a FL3000 fluorescence detector (LC-FL). In all experiments a PEEK Rheodyne 7125NS injection valve with a 20 µL sample loop was used (ThermoQuest, San Jose, CA, USA). The stationary-phase column was a Hypersil ODS C<sub>8</sub> (5 µm, 150 x 4.6 mm) from Analisis Vínicos (Tomelloso, Spain). Quantitation of BPA was made using a liquid chromatography/electrospray ion trap-mSUPRAS spectrometry system (LC/(ESI-IT)-MS) (1100 Series LC/MSD, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an automatic injector (injection volume 10µL). The stationary-phase column was a Hypersil ODS C<sub>8</sub> (3 µm 50 x 2.1 mm) from

Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain). A Mixtasel Selecta centrifuge (Barcelona, Spain) was used for sample preparation.

### **2.3. Determination of BPA, BaPy and OTA in liquid foods**

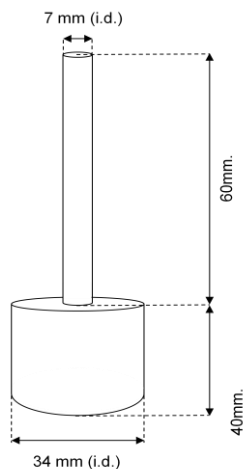
#### **2.3.1. Sample collection and preparation**

Liquid foods (n=19) were purchased in different supermarkets in Córdoba (Spain) and their content for BPA (canned tea and lemon soft drinks and canned white soda), BaPy (red and mate tea and soluble coffee brews) and OTA (must, vinegar, white and red wine and beer) was investigated. Sealed samples were stored at room temperature until analysis. Before extraction, carbonated soft drinks and beer samples were degSPRASEd in an ultrasonic bath for 30 min. Beer was then diluted with distilled water (1:1, v/v). Soluble coffee and tea brews were prepared according to the instructions on the product label. Thus, coffee (2g) was dissolved in 250 mL of boiling distilled water and tea brew was obtained by boiling 3.5 g of sample in 500 mL of distilled water in an enclosed steel kettle for 15 min. After cooling at room temperature, tea brews were filtered with an ashless filter paper and made up to 500 mL with distilled water.

#### **2.4. Supramolecular solvent-based extraction**

Decanoic acid (80 mg) was dissolved in THF (0.8mL for the analysis of OTA and BaPy and 1.7mL for the analysis of BPA) into specially designed centrifuge tubes (Figure 2). Then, the liquid food (15 mL; pH ~2-3.6, adjusted when necessary with HCl 12M) were added. Immediately, the supramolecular solvent spontaneously formed into the bulk solution. The mixture was stirred (5 min, 700 rpm) to favour BPA, BaPy and OTA extraction and then centrifuged at 3800 rpm (2200 g) for 10 min to accelerate the separation of the supramolecular solvent from the bulk solution. Beer samples required a centrifugation time of 30 min to achieve good separation. Finally, the volume of supramolecular solvent (typically 100-150  $\mu$ L), which

was standing at the narrow neck of the centrifuge tube (Figure 2), was calculated by measuring its height with a digital callipers, and 10 or 20  $\mu\text{L}$  were withdrawn with a microsyringe and directly injected into the LC-MS or the LC-FL system, respectively.



**Figure 2. Schematic picture of the glass centrifuge tube designed for SUPRAS-based extractions**

## 2.5. Quantitation of BPA, BaPy and OTA

Quantitation of BPA was carried out using LC/(ESI-IT)-MS. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (60:40, v/v) at a flow rate of 0.2  $\text{mL min}^{-1}$  for 15 min. The diver valve was programmed to send the mobile phase containing carboxylic acid and the most polar matrix compounds to waste. So, only 6 min after the beginning of the elution gradient program, the eluted components were sent to the ionisation source. MSUPRAS spectrometric analysis of BPA was performed in the ESI(-) mode.

The molecular ion ( $m/z$  227) was isolated and fragmented into the ion trap. Excitation of the ion was accomplished through collision with helium. The set of the parameters used was as follow: capillary voltage, 5.0 kV; capillary exit voltage, -165 V; skimmer, -44 V; trap drive, -31, source temperature, 350  $^{\circ}\text{C}$ ; drying gas, 5  $\text{L min}^{-1}$ ; nebulizer gas, 80 psi; maximal accumulation time, 100 ms, resonance excitation 1.12 V and fragmentation time 100 ms. Quantification was carried out under full scan (200-250  $m/z$ ) by monitoring the extracted ion chromatogram at the  $m/z$  of the daughter ion 212 [M-H- $\text{CH}_3$ ]. Calibration curves were performed in acetonitrile and were linear from 50 to 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Quantification of BaPy was carried out by LC-FL by measuring peak areas at 284 and 404 nm (excitation and emission wavelengths, respectively).

The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a flow rate of  $1\text{ mL min}^{-1}$ . The gradient elution program was: 25% A for 5 min and from 75% to 100% B in the next 20 min. Calibration curves in acetonitrile were linear in the range  $0.05\text{-}500\ \mu\text{g L}^{-1}$ .

LC-FL was also used for quantitation of OTA. The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 1% acetic acid. The gradient elution program was linear from 60% to 50% in A for 15 min and then isocratic with 50% A during 10 min. The flow-rate was  $1\ \text{mL min}^{-1}$ . OTA was monitored at 334 nm and 460 nm of excitation and emission wavelengths. Calibration curves for OTA in methanol were linear in the range  $2\text{-}5000\ \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

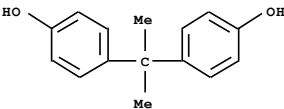
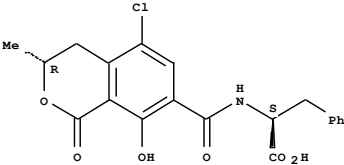
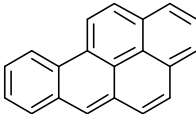
---

#### ***3.1. Supramolecular solvent description***

Decanoic acid dissolves in THF forming reverse micelles according to a sequential-type self-SUPRASociation model [29] with at least three critical aggregation concentrations ( $4.8\pm 0.2$ ,  $7.6\pm 0.4$  and  $51\pm 2$  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 phase. So, water is the external stimulus 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. As reverse micelles are produced from the protonated decanoic acid form ( $\text{pK}_a\ 4.8\pm 0.2$ ), pH values below 4 are required for the formation of the supramolecular solvent.

Figure 3A 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 2-fold mechanism for analyte solubilisation, namely van der Waals interactions in the decanoic acid hydrocarbon chains and hydrogen bonds in the micellar core, so a number of analytes can be extracted efficiently from aqueous samples with this solvent. Table 1 shows the chemical structures of the contaminants selected in this study and the constants and data of interest for their extraction.

Table 1. Structure, constants and number of hydrogen bonds for the target compounds				
	Structure	<sup>b</sup> Log Kow	pKa	<sup>a</sup> H Donor and Acceptor sum
<b>Bisphenol A (BPA)</b>		3.25	9.73	4
<b>Ochratoxin A (OTA)</b>		4.58	4.4 (acid group) 7.1 (alcohol group)	10
<b>Benzo(a)pyrene (BaPy)</b>		6.40	-	0

<sup>a</sup>Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V9.04 for Solaris  
<sup>b</sup>Logarithm of the octanol-water partition coefficient

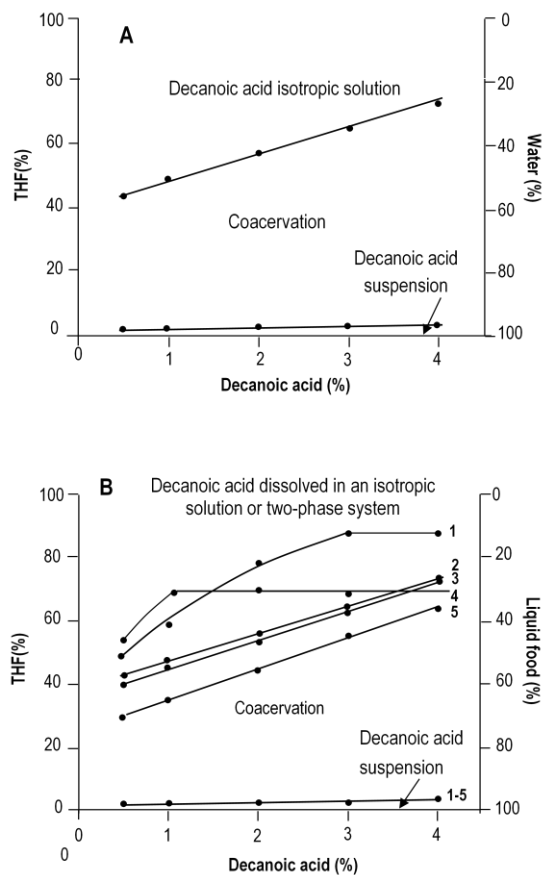
### 3.2. Formation of the supramolecular solvent in liquid foods

Liquid foods have high water content [29], so they were expected to induce the coacervation of reverse micelles of decanoic acid. Production of the

SUPRAS was investigated in ternary systems consisting of decanoic acid, THF and a variety of liquid foods, which were selected to cover a wide range of matrix composition. Table 2 reports the concentration of major matrix components in the liquid foods investigated [29,30] and Figure 3B depicts the phase diagrams obtained for some representative foods. Like water, all the samples induced the coacervation of decanoic acid and the phase diagrams showed three regions where the decanoic acid was precipitated, coacervated or solubilized. So, this supramolecular solvent is suitable to extract contaminants from liquid foods.

According to the effect of food matrix components on the upper boundary in the phase diagram compared with that obtained in distilled water, liquid foods may be classified in three groups.

Foods belonging to group I (vinegar, red and mate tea and coffee brews; e.g. Fig 3B, line 2) behaved similarly to water; those belonging to group II (beer and red and white wine; e.g. Fig.3B, lines 3 and 5) moved the upper boundary in the phase diagram toward lower THF percentages; and those belonging to group III (tea and lemon soft drinks, white soda and must; e.g. Fig.3B, lines 1 and 4) exerted a double effect, first they increased the THF percentage required to dissolve the supramolecular aggregates, and second they caused the separation of THF and the liquid food into two immiscible phases as the concentration of THF was above a limit [around 65% for must (line 4) and 90% for soft drinks (line 1)]. On the other hand, whitish and reddish precipitates, which were standing at the bottom of the supramolecular solvent as a very thin layer were extracted in beer and red wine samples, respectively.



**Figure 3. Phase diagrams for decanoic acid in binary mixtures of (A) THF and water and (B) THF and (1) lemon soft drink, (2) red tea infusion, (3) beer, (4) must and (5) wine**

In order to explain the observed phenomena and establish the basis for the prediction of phase diagrams as a function of food matrix components, a working hypothesis was established on the basis of the food compositions causing them (cf. Table 2). This hypothesis was as follows: above an unknown concentration, ethanol decreases the coacervating region; sugar increases the coacervating region and makes immiscible THF and liquid foods; and proteins and condensed tannins flocculate in the medium required to produce the supramolecular solvent. To support the correctness of this hypothesis, phase diagrams of ternary mixtures consisting of decanoic acid,

THF and synthetic aqueous solutions containing matrix components at different concentrations were constructed.

<b>Liquid food</b>	<sup>a</sup> <b>Water (g mL<sup>-1</sup>)</b>	<sup>a</sup> <b>Protein (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<sup>a</sup> <b>Sugar (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<sup>b</sup> <b>Condensed tannins (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<sup>a</sup> <b>Ethanol (% v/v)</b>
Beer	0.97	3.60-4.48	0	0.022	3-5
Red wine	0.87	0.74	6.42	0.6471	10-13
White wine	0.87	0.74	9.93	0.0085	10-13
Vinegar of white wine.	0.90	0	0.38	- <sup>c</sup>	0
Must of white wine	0.93	0.62	164.49	0.0040	0
Red tea infusion	0.99	0	3.18	0.1423	0
Mate tea Infusion	0.99	0.03	0.03	0.1423	0
Soluble coffee brew	0.99	1	3.41	0.001	0
White soda soft drink.	0.97	0.54	97.68	- <sup>c</sup>	0
Lemon soft drink.	0.97	0.74	110.05	- <sup>c</sup>	0
Tea soft drink.	0.98	0	97.89	- <sup>c</sup>	0

Sources: <sup>a</sup> United States Department of Agriculture (USDA) National Database for Standard Reference, <sup>b</sup> USDA Database for the proanthocyanidin content of selected Foods.  
<sup>c</sup> Foods not included in database, their condensed tannins content assumed to be undetectable.

Figure 4A shows some of the phase diagrams obtained for ethanolic aqueous solutions containing ethanol concentrations up to 15%. The upper boundary in the phase diagram moved towards lower THF percentages compared to aqueous solutions for ethanol percentages above 3% thus confirming the results obtained for beer and wine samples (cf. Fig.3B, lines 3 and 5), which have ethanol contents in the ranges 3-5% and 10-13%, respectively (cf. Table 2). The effect of ethanol was expected on the basis that the transition from the coacervation to the isotropic solution region occurs by dissolution of the supramolecular aggregates in the organic solvent.



Consequently, if a liquid food contains ethanol, lower THF amount will be necessary to dissolve the aggregates.

As all the foods included in group II contained a high sugar concentration (e.g. tea and lemon soft drinks, white soda and must, cf. Table 2), phase diagrams were constructed for sugary aqueous solutions containing a mixture of sucrose, glucose and fructose, each at the same concentration, at levels varying between 0 and 250 mg mL<sup>-1</sup>. Figure 4B shows some of the results obtained. Sugar concentrations below ~90 mg mL<sup>-1</sup> did not affect phase diagrams (Fig.4B, line 1). Above this concentration (Fig.4B, lines 2-4) sugary aqueous solutions behaved similarly to the foods included in group II (cf. Fig. 3B, lines 1 and 4). Thus, sugar increased the THF percentage required to dissolve the coacervate in an isotropic solution (curve portion of lines 2-4 in Fig.4B) and caused THF:water phase separation (linear portion of lines 2-4 in Fig.4B). The THF percentage at which this solvent and water were immiscible decreased as the sugar concentration increased and it was independent of the decanoic acid concentration. Thus, THF:water phase separation was also known to occur in binary systems made up of THF and sugary aqueous solutions (see broken lines in Fig. 4B). To our knowledge, no information about this phenomenon has been previously reported. However, it seems to be related to a salting out effect [31] due to the fact that sugars decrease water activity by producing a statistically reduced number of available hydrogen bonding sites, the effect increasing with sugar concentration [32]. We checked that the rough limit found for sugary aqueous solutions (~90 mg mL<sup>-1</sup>) from which sugar started exerting effect on phase diagrams was applicable to a range of commercial liquid foods. Thus, apple (sugar: 129.3 mg mL<sup>-1</sup>) and orange (sugar: 98.5 mg mL<sup>-1</sup>) juices affected the phase diagram and a cola low calorie soft drink (no sugar) did not affect it at all.

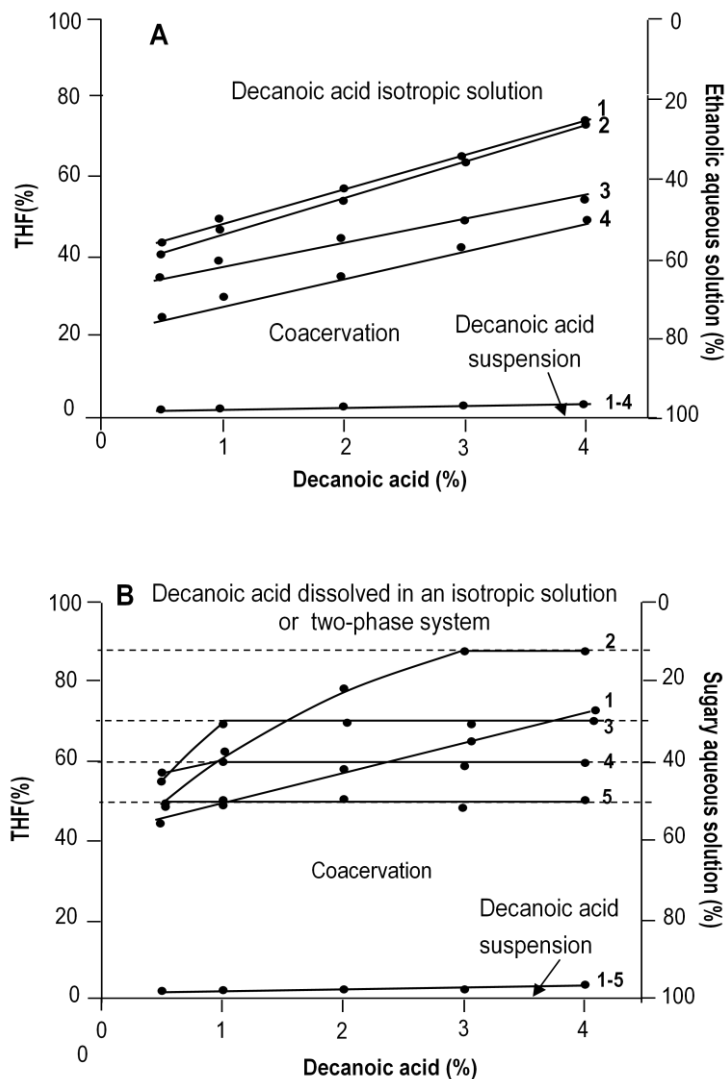


Figure 4. Phase diagrams for decanoic acid in binary mixtures of: (A) THF and ethanolic aqueous solutions containing (1) 2, (2) 4, (3) 8 and (4) 15% (v/v) of ethanol, and (B) THF and sugary aqueous solutions containing a mixture of sucrose, glucose and fructose, each at the same concentration, at an overall sugar concentration of (1) 50, (2) 115, (3) 150, (4) 180 and (5) 250 mg mL<sup>-1</sup>. The broken lines represent the boundaries for binary systems made up of THF and sugary aqueous solution for an overall sugar concentration of (2) 115, (3) 150, (4) 180 and (5) 250 mg mL<sup>-1</sup>. All the solutions were adjusted to pH 2.5

From an analytical point of view, it is worth noting that the effect of sugar and ethanol on phase diagrams is irrelevant to the use of the supramolecular solvent in extractions since analytical applications are usually carried out near the lower phase boundary in order to use the minimal amount of THF [28, 33].

To check whether the white precipitate observed in beer samples was caused by proteins, the effect of THF and decanoic acid reverse micelles on aqueous solutions containing a mixture of albumin from bovine serum, albumin from chicken egg white and lysozyme, each at the same concentration, at levels varying between 0 and 10 mg mL<sup>-1</sup>, was investigated. The results showed that proteins remained as stable colloids under the addition of THF, however they flocculated in the presence of decanoic acid reverse micelles and were extracted by the supramolecular solvent, from which separated after centrifugation as a thin layer at the bottom. This layer became wider as the protein concentration increased and was clearly detectable for proteins concentrations above 1 mg mL<sup>-1</sup>, which agrees with the results obtained for beer samples (protein concentration 4.48 mg mL<sup>-1</sup>, Table 2). On the other hand, the precipitate became denser and so the layer narrower as the THF concentration increased. It was checked that other liquid foods containing high protein concentration (e.g. orange juice, 5.90 mg mL<sup>-1</sup>) behaved similarly. The extraction of proteins by reverse micelles has previously been proposed in the literature [34] and constitutes a valuable method for their purification. On the other hand, regarding the reddish precipitate observed in red wine samples, condensed tannins have been reported to bond to proteins and form large colloidal particles, being the most frequent cause of hazes in these beverages [35]. So, these macromolecules were probably flocculated by the reverse micelles and extracted by the supramolecular solvent. Below, the influence of these precipitates on the extraction of the target analytes will be investigated.

### **3.3. Optimisation of the supramolecular solvent-based extraction**

Optimisation was carried out by extracting distilled water and liquid foods (15 mL) fortified with 1 mg L<sup>-1</sup> of OTA (wine, vinegar, must and beer), 20 mg L<sup>-1</sup> of BPA (white soda) and 0.2 mg L<sup>-1</sup> of BaPy (tea and coffee brews) under a variety of experimental conditions (0.1–3% decanoic acid; 5-15% THF; pH 0.5-3.6; stirring time 0-20 min). Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on the recoveries (R) and actual concentration factors (ACF) obtained for the target compounds. Phase volume ratios (PVR) were calculated as the ratio of the sample volume over the supramolecular solvent volume, so they represented the maximum concentration factors that could be obtained under given experimental conditions.

#### **3.3.1. Phase volumes ratio**

The volume of supramolecular solvent produced in water samples has previously been known to mainly depend on the concentration of decanoic acid and THF, which are major components of this solvent [33]. Water hardly incorporates to the extractant phase due to its non-solvent character for the reverse micelles. General equations have been developed for the prediction of the volume of SUPRAS produced in water solutions [33],  $y$ , as a function of the amount of decanoic acid ( $y = a + bx$ ), the percentage of THF ( $y = b_0 e^{b_1 z}$ ), and both the amount of decanoic acid and percentage of THF ( $y = 1.035 x e^{0.04731z}$ ). In these equations,  $y$  is given in  $\mu\text{L}$ ,  $x$  is the amount of decanoic acid in mg, and  $z$  the THF percentage (v/v).

In order to determine whether food matrix components influenced the volume of supramolecular solvent produced, a set of experiments was carried out using different decanoic acid amounts (50-500 mg), THF concentrations (2.5-30%) and liquid foods (cf. Table 3). The volumes of SUPRAS obtained were measured with a digital calliper and the relationship between these volumes and the amount of decanoic acid and THF was investigated. Table 3

shows the results obtained. Data in distilled water are also included for comparison.

**Table 3. Figures of merits of the linear relationship ( $y = a + bx$ ) between the coacervate volume ( $y$ ,  $\mu\text{L}$ ) and the amount of decanoic acid ( $x$ ,  $\text{mg}$ ) for 10% of THF and the exponential relationships ( $y = b_0 e^{b_1 z}$ ) between the coacervate volume ( $y$ ,  $\mu\text{L}$ ) and the concentration of THF ( $z$ , %) for 200  $\text{mg}$  of decanoic acid**

Liquid food	$y = a + bx$			$y = b_0 e^{b_1 z}$		
	$b \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{L mg}^{-1}$ )	$a \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{L}$ )	$^a R^2$	$b_0 \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{L}$ )	$b_1 \pm \text{SD}$	$^a R^2$
<i>Water</i>	1.67±0.04	0.7±3.9	0.997	205±7	0.045±0.002	0.996
<i>Beer</i>	1.79±0.07	5±26	0.994	220±8	0.046±0.005	0.980
<i>Beer diluted 1:1 with water</i>	1.68±0.04	3±10	0.991	207±6	0.045±0.005	0.990
<i>Red wine</i>	1.86±0.07	38±38	0.997	237±8	0.045±0.002	0.980
<i>White wine</i>	1.86±0.05	32±26	0.998	240±7	0.045±0.002	0.990
<i>Vinegar of white wine.</i>	1.64±0.10	7±7	0.990	201±5	0.044±0.006	0.991
<i>Must of white wine</i>	1.60±0.02	13±9	0.998	205±9	0.048±0.004	0.980
<i>Red tea infusion</i>	1.66±0.08	6±11	0.991	204±6	0.045±0.004	0.990
<i>Soluble coffee brew</i>	1.71±0.09	-8±10	0.993	210±10	0.046±0.007	0.991
<i>White soda soft drink.</i>	1.72±0.08	10±25	0.990	211±15	0.047±0.005	0.980
<i>Lemon soft drink.</i>	1.6±0.1	-2±20	0.980	200±4	0.046±0.005	0.992
<i>Tea soft drink</i>	1.6±0.1	4±11	0.980	200±7	0.045±0.002	0.990

<sup>a</sup> correlation coefficient ;  $n = 8$

As expected, the volume of coacervate was linearly dependent on the amount of surfactant used. This type of dependence indicates that the composition of the supramolecular solvent keeps constant when the other variables remain unchanged. The slopes of these linear relationships ranged between 1.60 and 1.86  $\mu\text{L mg}^{-1}$ . The highest values were obtained for wine (1.86  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ) and beer (1.79  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ) thus indicating that some proportion of the ethanol content in this samples incorporated to the coacervate. The rest of matrix components did not influence the volume of the supramolecular solvent. Thus, the mean value for the slope in liquid foods, excluding wine and beer, ( $1.66 \pm 0.04 \mu\text{L mg}^{-1}$ ) indicated that the composition of the supramolecular solvent was similar to that produced in water (1.67  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ).

The relationship between the volume of supramolecular solvent and the THF percentage was exponential for all the foods investigated (see Table 3). The parameter ( $b_1$ ), which describes how rapidly the volume of coacervate increases as the THF (%) does [33], was found to be similar in all the experiments (mean value  $0.046 \pm 0.001$ ), thus indicating that it was not influenced by matrix components. On the contrary, the parameter  $b_0$ , which is linearly related to the amount of decanoic acid [33], increased for ethanol-containing foods (e.g. beer and wines in Table 3). No significant differences were found for  $b_0$  from the rest of liquid foods (mean  $204 \pm 3 \mu\text{L}$ ) and water (205  $\mu\text{L}$ ).

According to these results, the highest phase volume ratios will be obtained using low amounts of decanoic acid and THF. So, coacervate compositions near the lower boundary in the phase diagrams (Figure 3B) are recommended for extraction.

### **Recoveries and actual concentration factors**

The influence of variables on recoveries (R) was studied and the actual concentration factors, ACF [ $0.01R(\%) \times \text{phase volume ratio (PVR)}$ ], were calculated from the volumes of supramolecular solvent predicted by the respective equations (cf. Table 3). Tables 4 and 5 show the results obtained

for the different foods investigated as a function of decanoic acid and THF concentration, respectively. Data in distilled water were also included in order to evaluate the effect of matrix components on analyte recoveries and consequently on ACF.

Matrix-dependent recoveries were found at the lowest decanoic acid concentration investigated (0.1% in Table 4). The recoveries increased as the amount of decanoic did and it was above 79% and matrix-independent, except for OTA in beer, at a decanoic acid concentration as low as 0.5%. The effect observed in beer was due to the adsorption of OTA in the flocculated protein layer standing at the bottom of the SUPRAS. The adsorption decreased progressively as the decanoic acid increased and became negligible at concentrations above 2%, due to the gradual increase in the coacervate/protein layer volume ratio. Dilution of beer with water (1:1; v/v) permitted to overcome this matrix-effect and beer behaved as the rest of foods (Table 4). Contrarily, the precipitate caused by condensed tannins in red wines scarcely affected OTA recoveries despite it was standing at the bottom of the SUPRAS after sample centrifugation too. On the other hand, ACF values decreased as the decanoic acid concentration did (because of the decrease in phase volume ratios predicted by the equations proposed in Table 3). A concentration of 0.5% was selected as optimal on the basis that it provided the best ACF for the target compounds at R values higher than the threshold value (70%) recommended by different international organisations for the extraction of contaminants [34-36].

**Table 4. Mean percent recoveries and standard deviations ( $R \pm SD$ , %) and actual concentration factors (ACF) obtained for OTA, BPA and BaPy in liquid foods as a function of decanoic acid concentration (% w/v)**

	Food	Decanoic acid (%)					
		0.1		0.25		0.5	
		$R \pm^a SD$	ACF	$R \pm^a SD$	ACF	$R \pm^a SD$	ACF
<b>OTA</b>	Water	60±3	307	83±4	175	93±4	100
	Wine	40±4	193	76±3	144	89±3	85
	Vinegar	44±3	241	84±3	184	93±5	102
	Must	55±4	309	84±4	189	92±4	104
	Beer	29±3	145	60±5	120	80±3	81
	Beer:water 1:1 v/v	39±4	99	70±4	97	89±4	48
<b>BPA</b>	Water	50±2	258	73±4	157	82±2	89
	White soda	27±2	140	64±3	133	79±3	83
<b>BaPy</b>	Water	64±3	330	90±3	192	95±4	103
	Tea infusion	30±3	162	82±5	178	93±4	93
	Soluble coffee	34±3	178	84±4	178	92±5	92
		1		2		3	
		$R \pm^a SD$	ACF	$R \pm^a SD$	ACF	$R \pm^a SD$	ACF
<b>OTA</b>	Water	98±1	50	98±2	26	100±3	18
	Wine	93±2	45	99±5	24	98±2	15
	Vinegar	98±4	54	101±4	27	99±3	18
	Must	99±2	56	98±5	27	99±3	18
	Beer	89±3	45	95±3	24	99±4	17
	Beer:water 1:1 v/v	93±2	26	98±4	13	99±2	9
<b>BPA</b>	Water	92±2	50	95±4	26	100±4	18
	White soda	87±3	45	92±2	24	97±3	17
<b>BaPy</b>	Water	100±2	54	99±2	26	101±2	18
	Tea infusion	95±3	51	98±3	26	98±3	18
	Soluble coffee	96±3	51	99±4	26	100±5	18

<sup>a</sup>  $n=3$ ; THF =10 %



**Table 5. Mean percent recoveries and standard deviations ( $R \pm SD$ , %) and actual concentration factors (ACF) obtained for OTA, BPA and BaPy in liquid foods as a function of tetrahydrofuran concentration (% v/v)**

Contaminant	Food	Tetrahydrofuran (%)					
		5		10		15	
		$R \pm^a SD$	ACF	$R \pm^a SD$	ACF	$R \pm^a SD$	ACF
<b>OTA</b>	Water	95±3	141	94±2	104	95±2	81
	Wine	89±3	112	90±2	86	80±2	58
	Vinegar	93±3	141	90±2	102	93±2	81
	Must	91±4	132	92±4	104	90±2	73
	Beer	70±5	96	81±3	83	83±3	65
	Beer diluted with water 1:1	89±5	65	89±3	49	91±3	39
<b>BPA</b>	Water	73±3	108	82±2	89	82±3	70
	White soda	70±3	98	79±3	83	80±3	62
<b>BaPy</b>	Water	91±3	135	95±4	103	100±2	85
	Tea infusion	90±2	133	92±4	93	99±2	84
	Soluble coffee	90±3	129	93±5	92	99±3	81

<sup>a</sup> n= 3; decanoic acid= 0.5%

The influence of THF (5-15%) on R depended on the type of analyte; recoveries hardly changed for OTA and BaPy and slightly increased for BPA as the THF concentration did up to 10% (Table 5). Except for no diluted beer, no significant matrix effects were observed at the different percentages of THF investigated. A percentage of 5% was selected for OTA and BaPy while a 10% THF was recommended for BPA. Recoveries higher than about 80% were obtained at these THF concentrations.

The pH of samples did not affect recoveries in the range 2-3.6, but it caused a slightly decreased at lower pHs (e.g. recovery of OTA in wines was

80% at pH 0.5). As soft drinks and wine-based products have pHs between 2 and 3.6, it was not necessary to adjust them before extraction, while the pH of tea and coffee brews (pH 6-7) and beer (pH 4-4.5) was adjusted to 2.5 to ensure that decanoic acid was protonated, which is a requisite to form the SUPRAS. Extraction equilibrium conditions were rapidly reached; maximal recoveries for the three analytes in all the matrices investigated were achieved after stirring the samples for 5 min at 700 rpm.

A practical aspect to be considered was the volume of liquid food sample to analyse, because although it does not influence recoveries or concentration factors, it determines the total mSUPRAS of decanoic acid at a given surfactant concentration and consequently the volume of coacervate obtained. Our criterion was to obtain at least 100  $\mu\text{L}$  of supramolecular solvent per sample, which permitted 2-3 different chromatographic runs in a reliable way (20  $\mu\text{L}$  per injection). So, a volume of liquid food of 15 mL (7.5 mL for beer and made up to 15mL with distilled water) was chosen, which provided volumes of supramolecular solvent between 100 and 150  $\mu\text{L}$ .

### **3.4. Analytical performance**

Calibration curves for the target compounds were run using standard solutions prepared in acetonitrile (BPA and BaPy) or methanol (OTA). No differences in peak areas or retention times were observed for the analytes injected in organic solvent or the supramolecular solvent. The retention times for analytes, linear ranges, slopes of the calibration curves and correlation coefficients are included in Table 6. The instrumental quantification and detection limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 10 and 3, respectively. From these values and considering the ACF obtained for the different foods investigated, under the optimal experimental conditions proposed in section 2.3.2, a range of estimated method quantification and detection limits were calculated (Table 6). These values were far below the current threshold limits established by the European Union with regards to the target compounds in different foodstuffs, i.e. 2 mg  $\text{Kg}^{-1}$  for OTA in wine and wine derived products [38],

600 mg Kg<sup>-1</sup> for BPA as specific migration limit [39], values between 1 and 10 mg Kg<sup>-1</sup> for BaPy [40]. Currently, a recommended level of 0.2 µg L<sup>-1</sup> has been proposed for beer [41].

**Table 6. Analytical performance of the methods developed for the analysis on BPA, OTA and BaPy in liquid foods**

Target	Retention time (min)	Calibration			Method <sup>b</sup> LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Method <sup>c</sup> LOD (ng L <sup>-1</sup> )
		Linear range (µg L <sup>-1</sup> )	Slope±SD (L µg <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> r		
<b>BPA</b>	8.1	50-1000	80.02±0.09	0.995	562-602	200-215
<b>OTA</b>	15.8	2-5000	102.6±0.2	0.9998	14-18 (31 for beer)	4-5 (9 for beer)
<b>BaPy</b>	15.6	0.05-500	3460±5	0.998	0.37-0.39	0.11-0.13

<sup>a</sup>correlation coefficient; n=7; <sup>b</sup> estimated quantification limits of the method; <sup>c</sup> estimated detection limits of the method.

The possible interference of matrix components that could elute with the analytes was SUPRASessed by comparison of the slopes of the calibration curves for each compound (n =7) obtained from standards in distilled water with those obtained from liquid foods, namely three samples for OTA (wine, vinegar and must), two samples for BaPy (soluble coffee and tea) and two samples for BPA (white soda and tea soft drink). Slopes in distilled water standards were 7.0±0.4 L mg<sup>-1</sup> for BPA, 13.2±0.4 L mg<sup>-1</sup> for OTA and 456±6 L mg<sup>-1</sup> for BaPy, while in foods were in the ranges 6.9-7.2 L mg<sup>-1</sup> for BPA, 11.7-13.8 L mg<sup>-1</sup> for OTA and 420-442 L mg<sup>-1</sup> for BaPy, with relative standard errors of the slopes between 2 and 6 %. Differences in both types of calibration curves were only due to the slightly different ACF values reached in the foods compared to water, so matrix components were not expected to interfere in the determination of the three target compounds.

The precision of the method for the determination of OTA, BaPy and BPA was SUPRASessed by the extraction of eleven independent fortified samples, which consisted of wines (n=4), musts (n=4) and vinegar (n=3) for OTA, red tea (n=3), mate tea (n=3) and soluble coffee (n=5) for BaPy and white soda (n=5) and tea (n=6) soft drinks for BPA. Values expressed as relative standard deviations were 5.1, 5.4 and 6.1% for OTA, BaPy and BPA, respectively.

### **3.5. Analysis of liquid foods**

A variety of liquid foods were analysed belonging to different trademarks than those used for optimisation. Table 7 shows the concentrations found for the different target compounds as well as the recoveries obtained after spiking the samples with variable amounts of OTA, BaPy and BPA, which are specified in the table footnote. Both the concentrations of analytes and recoveries were expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. Recoveries ranged between 79 and 93%, 90 and 96 and 78 and 82% for OTA, BaPy and BPA respectively, with relative standard deviations ranging from 1 to 7%. OTA was detected in vinegar, must and beer samples, the concentrations ranging between 92 and 177 ng L<sup>-1</sup>, BaPy was quantified in samples of tea and coffee at concentrations from 1.5 to 16.6 ng L<sup>-1</sup> (equivalent to 0.22 and 2.1 mg Kg<sup>-1</sup>, respectively) and BPA was detected in two canned soft drinks and quantified in one of them (tea beverage) at a level of 2.3 µg L<sup>-1</sup>. These values were far below the established European threshold limits, except for the concentration of BaPy found in the mate tea sample (2.1 mg Kg<sup>-1</sup>).

**Table 7. Mean concentrations ( $C \pm {}^aSD$ ,  $ng L^{-1}$ ) and recoveries ( $R \pm {}^aSD$ ,%) along with their respective standard deviations found for OTA, BaPy and BPA in the analysis of liquid foods**

Liquid food	OTA		BaPy		BPA	
	C $\pm$ SD	R $\pm$ SD	C $\pm$ SD	R $\pm$ SD	C $\pm$ SD	R $\pm$ SD
White wine, brand 1	n.d.	92 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	-	-	-	-
White wine, brand 2	n.d.	90 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	-	-	-	-
Red wine, brand 1	n.d.	90 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	-	-	-	-
Red wine, brand 2	n.d.	92 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	-	-	-	-
Vinegar (white wine), brand 1	< LOQ	90 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	-	-	-	-
Vinegar (white wine), brand 2	92 $\pm$ 5	93 $\pm$ 4 <sup>d</sup>	-	-	-	-
Must (white wine), brand 1	n.d.	91 $\pm$ 3 <sup>f</sup>	-	-	-	-
Must (white wine), brand 2	177 $\pm$ 1	92 $\pm$ 4 <sup>e</sup>	-	-	-	-
Beer, brand 1	n.d.	81 $\pm$ 2 <sup>f</sup>	-	-	-	-
Beer, brand 2	115 $\pm$ 4	79 $\pm$ 2 <sup>e</sup>	-	-	-	-
Mate tea	-	-	16.6 $\pm$ 0.7	94 $\pm$ 4 <sup>g</sup>	-	-
Red tea, brand 1	-	-	4.9 $\pm$ 0.2	94 $\pm$ 4 <sup>h</sup>	-	-
Red tea, brand 2	-	-	n.d.	96 $\pm$ 4 <sup>h</sup>	-	-
Soluble coffee, brand 1	-	-	n.d.	91 $\pm$ 5 <sup>i</sup>	-	-
Soluble coffee, brand 2	-	-	1.51 $\pm$ 0.01	90 $\pm$ 5 <sup>j</sup>	-	-
Soda (canned)	-	-	-	-	n.d.	82 $\pm$ 6 <sup>k</sup>
Lemon drink (canned)	-	-	-	-	<LOQ	80 $\pm$ 3 <sup>k</sup>
Tea (canned), brand 1	-	-	-	-	n.d.	80 $\pm$ 3 <sup>l</sup>
Tea (canned), brand 2	-	-	-	-	2300 $\pm$ 100	78 $\pm$ 4 <sup>l</sup>

<sup>a</sup>n=3; n.d.: non detected; <LOQ: below the quantification limit; Fortification levels: <sup>b</sup>(25  $ng L^{-1}$ ); <sup>c</sup>(65  $ng L^{-1}$ ); <sup>d</sup>(92  $ng L^{-1}$ ); <sup>e</sup>(150  $ng L^{-1}$ ); <sup>f</sup>(40  $ng L^{-1}$ ); <sup>g</sup>(15  $ng L^{-1}$ ); <sup>h</sup>(5  $ng L^{-1}$ ); <sup>i</sup>(0.7  $ng L^{-1}$ ); <sup>j</sup>(1  $ng L^{-1}$ ); <sup>k</sup>(1000  $ng L^{-1}$ ); <sup>l</sup>(5000  $ng L^{-1}$ )

Figures 5-7 compare the chromatograms obtained from standard solutions (A) with those obtained from the analysis of different non spiked foodstuffs contaminated with OTA (Fig. 5), BaPy (Fig. 6) and BPA (Fig. 7). No interference from matrix components was detected for any of the samples analysed.

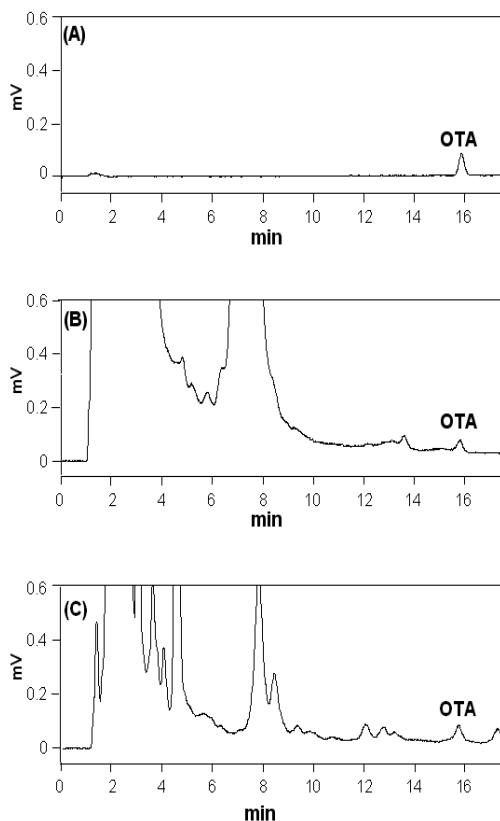


Figure 5. LC/Fluorescence chromatograms obtained from (A) OTA ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in methanol and two contaminated samples: (B) white wine must ( $177 \text{ ng L}^{-1}$ ) and (C) vinegar ( $92 \text{ ng L}^{-1}$ )

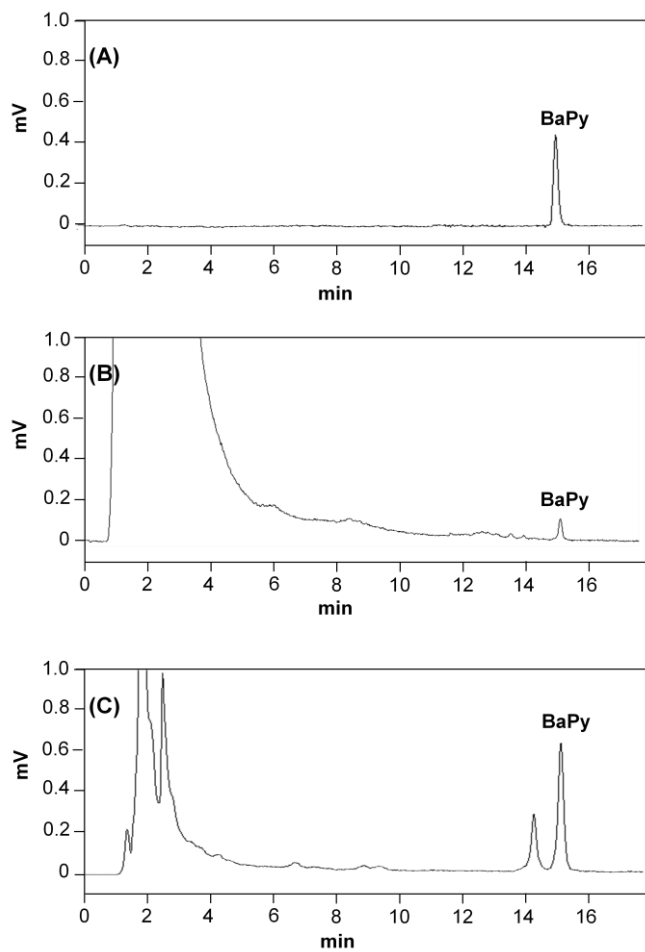
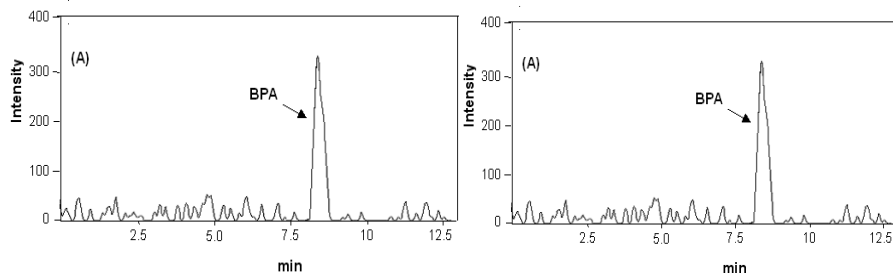


Figure 6. LC/Fluorescence chromatograms obtained from (A) BaPy ( $10.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in acetonitrile and two contaminated samples with BaPy, (B) mate tea brew ( $16.6 \text{ng L}^{-1}$ ) and (C) instant coffee brew ( $1.5 \text{ng L}^{-1}$ )



**Figure 7. LC/MS<sup>2</sup> extracted ion chromatogram obtained from (A) BPA (300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in acetonitrile and (B) a contaminated tea soft drink with BPA (2.3  $\mu\text{g L}^{-1}$ )**

## 4. CONCLUSIONS

The results obtained in this research prove that supramolecular solvents are a promising strategy to simplify sample treatment in liquid food analysis. Supramolecular solvents are produced in situ through self-SUPRASemibly processes that are within everyone's reach. Likewise, extraction procedures are simple and do not require special lab equipment. The high concentration of decanoic acid in the extractant phase ( $\sim 0.6 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ) and, mainly the capability of analyte solubilization of the nanostructures formed, permits the favourable partition of analytes using a quite low volume of supramolecular solvent (100-150  $\mu\text{L}$ ) for 15 mL of sample in the application here developed). Consequently, actual concentration factors around 65-141 are easily obtained using a single-step extraction and without the need of solvent evaporation. A valuable SUPRASet of this strategy is that major matrix components in the liquid foods (e.g. proteins) are not dissolved in the extractant phase; they flocculate and remains as a precipitate at the bottom of the supramolecular solvent. So, crude extracts can be directly injected in the chromatographic system.

In this research, methods have been developed that permit the determination of OTA, BPA and BaPy in liquid foods at levels far below their respective European legislative threshold limits with recoveries higher than 80% and RSD values below 7%. Each complete extraction procedure took about 15-20 min and several samples could be simultaneously extracted,



so sample throughput will mainly depend on the chromatographic analysis of the target compounds.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MCyT (Project CTQ2005-00643). A. Ballesteros-Gómez acknowledges to the Spanish MEC the doctoral fellowship awarded (AP2005-4275).

### **REFERENCES**

- [1] K. Rydgrway, S.P.D. Lalljie, R.M. Simth, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 36.
- [2] S.J. Kubacki, H. Goszc, Pure Appl. Chem. 60 (1998) 871.
- [3] A.R. Brause, M.W. Trucksess, F.S. Thomas, S.W. Page, J. AOAC Int. 83 (2000) 1387.
- [4] S. MacDonald, M. Long, J. Gilbert, I. Felgueiras, J. AOAC Int. 83 (2000) 1387.
- [5] S.A.V. Toufni, R.M.D. Machado, M.C.R. Camargo, S.H.P. Vitorino, E. Vicente, M.C.F. Toledo, Food Chem. 90 (2007) 334.
- [6] P. Varelis, D. Balafas, J. Chromatogr. A 883 (2000) 163.
- [7] D. Lin, T. Youying, Z. Lizhong, Food Chem. Toxicol. 43 (2005) 41.
- [8] R. Rodil, M. Schellin, P. Popp, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 288.
- [9] E. González-Penas, C. Leache, M. Viscarret, A. Pérez de Obanos, C. Araguás, A. López de Cerain, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 163.
- [10] A. Bjorhovde, T.G. Halvorsen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Anal. Chim. Acta 491 (2003) 155.
- [11] E. Zhao, L. Han, S. Jiang, Q.Wang, Z. Zhou, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 269.

- [12] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 89.
- [13] E. Watanabe, Y. Yoshimura, Y. Yuasa, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 199.
- [14] V. Pichon, A.I. Krasnova, M.C. Henion, *Chromatographia* 60 (2004) S221.
- [15] IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972) 611.
- [16] B. Gander, M.J. Blanco-Prieto, C. Thomasin, Ch. Wandrey, D. Hunkeler, in: J. Swarbrick, J.C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [17] F.M. Menger, B.M. Sykes, *Langmuir* 14 (1998) 4131.
- [18] M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 4763.
- [19] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.
- [20] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [21] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.
- [22] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.
- [23] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.
- [24] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.
- [25] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.
- [26] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 147.
- [27] F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.
- [28] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

- [29] United States Department of Agriculture (USDA) Nacional Database for Standard Reference. Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
- [30] United States Department of Agriculture (USDA) Nacional Database for the proanthocyanidin content of selected foods, available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/PA/PA.html987>.
- [31] F.A. Shibab, F.W. Ezzedeem, S.J. Stohs, J. Pharm. Sci. 77 (1988) 455.
- [32] M.A. Etman, V.F. Naggar, Int. J. Pharm. 58 (1990) 177.
- [33] A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 603 (2007) 51.
- [34] C. Jolival, N. Minier, N. Renon, Fluid Phase Equilib. 53 (1989) 483.
- [35] K.J. Siebert, LWT-Food Sci. Technol. 39 (2006) 987.
- [36] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemicals, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999.SANCO/3103/2000, Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, second ed., 1999/2000.
- [37] D. Barceló, Environmental Analysis, Techniques Applications Quality Assurance, Elsevier, Amsterdam, 1993, p. 149.
- [38] Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A, Official J. Eur. Commun., L25 (2005) 3.
- [39] Commission Directive 2004/19/EC, of 1 March 2004, relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs, Official J. Eur. Commun., L71 (2005) 8.
- [40] Commission Regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons, Official J. Eur. Union, L34 (2005) 3.
- [41] B. Burdaspal, T. Legarda, J. Gilbert, J. AOAC Int. 84 (2001) 1445.

# Capítulo 4

---

***Tetrahydrofuran–water extraction, in-line clean-up and selective liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of perfluorinated compounds in food at the low picogram per gram level***

---



---

**Tetrahydrofuran–water extraction, in-line clean-up and selective liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of perfluorinated compounds in food at the low picogram per gram level\***

---

**ABSTRACT**

A new solvent extraction system was developed for extraction of PFCs from food. The extraction is carried out with 75:25 (v/v) tetrahydrofuran:water, a solvent mixture that provides an appropriate balance of hydrogen bonding, dispersion and dipole–dipole interactions to efficiently extract PFCs with chains containing 4–14 carbon atoms from foods. This mixture provided recoveries above 85% from foods including vegetables, fruits, fish, meat and bread; and above 75% from cheese. Clean-up with a weak anion exchange resin and Envi-carb SPE, which were coupled in line for simplicity, was found to minimize matrix effects (viz. enhancement or suppression of electrospray ionization). The target analytes (PFCs) were resolved on a perfluorooctyl phase column that proved effective in separating mass interferences for perfluorooctane sulfonate (PFOS) in fish and meat samples. The mass spectrometer was operated in the negative electrospray ionization mode and used to record two transitions per analyte and one per mass-labeled method internal standard. The target PFCs were quantified from solvent based calibration curves. The limits of detection (LODs) were as low as 1–5 pg analyte g<sup>-1</sup> food; by exception, those for C4 and C5 PFCs were somewhat higher (25–30 pg g<sup>-1</sup>) owing to their less

**\*A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, S. van Leuween  
*J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5913-5921**

favourable mass response. To the best of our knowledge these are the best LODs for PFCs in foods reported to date. The analysis of a variety of foods revealed contamination with PFCs at levels from 4.5 to 75  $\text{pg g}^{-1}$  in 25% of samples (fish and packaged spinach).  $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{14}$  PFCs were found in fish, which testifies to the need to control long-chain PFCs in this type of food. The proposed method is a useful tool for the development of a large-scale database for the presence of PFCs in foods.

## **1. INTRODUCTION**

---

Human exposure to perfluorinated compounds (PFCs) is currently receiving considerable attention from scientists and policy makers owing to the ubiquity of these substances in human blood and tissue samples worldwide, but particularly in industrialized areas [1,2]. The most abundant PFC in human samples is perfluorooctane sulfonate (PFOS), which was widely used; however, other perfluoroalkyl sulfonates (PFASs) and carboxylic acids (PFACs) are also frequently detected [1–3]. PFCs are toxic, highly persistent and bioaccumulative; this has led the European Union [4], North America [5] and major manufacturers such as 3M [6] and DuPont [7] to impose stringent restrictions on the production and use of compounds such as PFOS and perfluorooctanoic acid (PFOA).

Although humans are exposed to PFCs from a number of sources, food (drinking water included) is believed to be their dominant intake pathway. PFCs can contaminate food by bioaccumulation of, especially, longer chain members in fish and shellfish (a result of oceans acting as contaminant sinks) [8] or contact with packaging material. Few systematic investigations on PFC levels in food have conducted to date mostly in North America and Western Europe [9-15]. Although no oral reference dose values for PFCs have as yet been established, the European Food Safety Authority (EFSA) has completed a risk assessment on PFOS and PFOA in the food chain and established a tolerable daily intake (TDI) of 150 and 1500  $\text{ng kg}^{-1}$  body weight  $\text{day}^{-1}$ , respectively [16]. EFSA has noted an urgent need for data on

PFC levels in various food items in order to better understand contamination routes and monitor trends in exposure levels.

Analysing PFCs in such complex and variable matrices as foods is a rather challenging task in many ways. The PFCs typically encountered in food include ionic, water-soluble short chain and non-polar long-chain compounds (viz. C<sub>4</sub>–C<sub>14</sub> PFACs and C<sub>4</sub>–C<sub>8</sub> PFASs), the extraction efficiency of which is strongly dependent on solvent polarity. The PFC concentrations measured so far suggest their presence at usually low levels (pg g<sup>-1</sup> to low ng g<sup>-1</sup> range) in primary foods such as meat, milk, cereals, oil, fruits and vegetables, but higher levels (ng g<sup>-1</sup> to µg g<sup>-1</sup>) for some specific compounds in fish and offal foods [1]. Whereas the quantitation of PFCs in fish is generally straightforward and has improved considerably in recent years [17-19], scaling down to the pg g<sup>-1</sup> level requires using highly efficient extraction methods in addition to extensive, complex clean-up and time-consuming solvent reduction procedures.

Only a limited number of methods are currently available to investigate dietary exposure to PFCs [10,11,20,21]. Food samples (1–10 g, wet weight) are usually serially extracted with medium-polar solvents such as methanol or acetonitrile, whether directly or following alkaline digestion. Commonly, a clean-up procedure involving successive treatment with dispersive graphitized carbon (ENVI-carb) and/or filtration through a weak anion-exchange (WAX) SPE material is needed. Liquid chromatography (LC)/negative electrospray ionization (ESI)/triple quadrupole MS/MS has become the de facto standard for quantifying PFCs inasmuch as it provides detection limits in the range 1–100 pg. Most LC separation procedures for this purpose use standard C<sub>18</sub> or C<sub>8</sub> phases; however, use of fluorinated stationary phases to separate PFCs by fluorine content and conventional reversed phase mechanisms is being fostered to prevent co-elution of known biological mass interferences with PFOS [22] and PFHxS [23].

These methods, however, are still confronted with many problems. Thus, they provide low recoveries which are strongly dependent on the chain length and polar groups present in the particular PFC, as well as on the



sample matrix components. For example, the absolute recoveries from lamb liver provided by the most sensitive method reported so far (detection limits 1–650  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) [11] are in the range 83–72% for  $\text{C}_{4-8}$  PFASs and 65–17% for  $\text{C}_{6-12}$  PFACs; these recoveries are matrix-dependent and differ from those for other foods (e.g. 30–70% for  $^{13}\text{C}_4$ -PFOS and 60–133% for  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA). In addition, little information is available about the concentrations of the shorter- ( $\text{C}_{4-5}$ ) and longer-chain ( $\text{C}_{13-14}$ ) PFACs in foods owing to their poor extraction by medium-polar solvents.

In this work, we developed a simple, fast, efficient method for the quantitative extraction of  $\text{C}_4$ – $\text{C}_{14}$  PFACs and  $\text{C}_4$ – $\text{C}_8$  PFASs from a variety of representative food items prior to their LC–ESI-MS/MS determination. Mixtures of tetrahydrofuran (THF) and water were used for this purpose on the grounds of their large differences in dielectric constant ( $\epsilon$ ) and Hildebrand solubility parameter ( $\delta$ ), and hence of the ability to prepare mixed solvents spanning a wide range of dispersion, dipole–dipole and hydrogen bonding forces [24] which were examined with a view to facilitating solubilization of all PFCs. Sample clean-up was done by using an in-line coupled anion exchange resin and graphitized carbon SPE; and LC was done on a perfluorooctyl stationary phase to prevent matrix mass interferences for PFASs. The results are discussed below.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

---

### **2.1. Chemicals**

All chemicals were analytical reagent-grade and used as supplied. Both target and mass-labeled PFCs were supplied by Wellington Laboratories, in 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solutions. The fourteen target PFCs studied were as follows: perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPeA), perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA); perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluoroundecanoic acid (PFUDA),

perfluorododecanoic acid (PFDoA), perfluorotridecanoic acid (PFTrDA), perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA), potassium perfluoro-1-butanesulfonate (PFBS), potassium perfluoro-1-hexanesulfonate (PFHxS) and potassium perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS). The stable isotope analogues  $^{13}\text{C}_4\text{PFBA}$ ,  $^{13}\text{C}_2\text{PFHxA}$ ,  $^{18}\text{O}_2\text{PFHxS}$ ,  $^{13}\text{C}_4\text{PFOA}$ ,  $^{13}\text{C}_5\text{PFNA}$ ,  $^{13}\text{C}_2\text{PFDA}$ ,  $^{13}\text{C}_4\text{PFOS}$  and  $^{13}\text{C}_2\text{PFUDA}$  were used as surrogate standards (ISs); and  $^{13}\text{C}_8\text{PFOA}$ ,  $^{13}\text{C}_8\text{PFOA}$  and  $^{13}\text{C}_7\text{PFUDA}$  as injection ISs. Sodium taurodeoxycholate hydrate and ammonium formate were supplied by Sigma. Tetrahydrofuran (THF) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and methanol (MeOH) and LC-grade water were supplied by JT Baker (Deventer, The Netherlands). Stock standard solutions each containing a mixture of target PFCs, surrogate ISs or injection ISs, at a  $100\text{ ng mL}^{-1}$  concentration each were prepared separately in methanol and stored in closed polypropylene bottles at room temperature.

## 2.2. Instrumentation

The LC–MS–MS system used, an Agilent 6410 Triple Quadrupole mass spectrometer with an electrospray interface operating in the negative ion mode, was coupled to an Agilent 1200 Series LC system (Palo Alto, CA, USA). A Fluorosep RP Octyl column (particle size  $5\text{ }\mu\text{m}$ , i.d.  $2.1\text{ mm}$ , length  $15\text{ cm}$ ) supplied by ES Industries (West Berlin, NJ, USA) was used as stationary phase. A Waters Symmetry  $\text{C}_{18}$  guard column (particle size  $5\text{ }\mu\text{m}$ , i.d.  $3.9\text{ mm}$ , length  $20\text{ mm}$ ) obtained from Waters (Milford, Massachusetts, USA) was inserted before the LC column. A Water Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (particle size  $5\text{ }\mu\text{m}$ , i.d.  $2.1\text{ mm}$ , length  $50\text{ mm}$ ) also supplied by Waters was used to assess the advantages of the fluorinated column in terms of selectivity. Oasis WAX (6cc,  $150\text{ mg}$ ) and Supelclean ENVI-carb (6cc,  $250\text{ mg}$ ) cartridges supplied by Waters and Supelco (Zwijndrecht, The Netherlands), respectively, were used for sample clean-up. The following equipment was used for sample preparation and/or extraction: an Ultra-Turrax T25 Basic homogenizer from Ika (Werke, Germany), an orbital shaker (SM 30, Edmund Buhler GmbH, Hechingen, Germany), a crushing

machine, a centrifuge (SW 12, Firlabo, Meyzieu, France), an ultracentrifuge (Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech, , Lelystad, Netherlands) and a freeze-dryer (Lymph lock 1 L, Labconco, Kansas City, MO, USA).

### **2.3. Determination of PFCs in foods**

#### **2.3.1. Sample preparation and preservation**

Muscle fillets of raw fish (herring, pangasius, salmon and flounder) and meat (pork and chicken), whole-grain bread, vegetables (spinach and carrot), fruits (orange and apple), cheese (*Gouda*) and sunflower oil samples were bought at local supermarkets in Amsterdam (The Netherlands) in August–September 2009. An amount of 50 g of fish, meat or fruit was homogenized in an Ultra-Turrax homogenizer T25 equipped with S25N-8g and S25N-25g dispersing elements; on the other hand, cheese and vegetables were homogenized in a crushing machine. About 10 g of each homogenized sample (2.5 g for cheese) was weighed in a 50 mL polypropylene (PP) tube, freeze-dried for 24 h and stored frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Sunflower oil samples (5 g) were used untreated.

#### **2.3.2. Tetrahydrofuran–water extraction**

Freeze-dried vegetable, fruit, meat and fish samples were fortified with a  $125\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  concentration of the surrogate ISs and extracted with 20 mL of 75:25 (v/v) THF:water by shaking in 50 mL PP tubes at 500 rpm for 10 min. Cheese samples were spiked with  $500\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  concentrations of the surrogate ISs. The volume of THF:water mixture used to extract bread was 30 mL. Sunflower oil samples (5 g fresh weight,  $125\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  IS) were cleaned up directly. After extraction, samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min and 10 mL of their clear supernatant (15 mL for bread) was transferred to 15 mL PP tubes and allowed to evaporate down to 6 mL at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen stream; because only THF evaporated, the concentrated solution contained 42% water. The samples were then diluted to 15 mL with distilled

water and centrifuged again at 3500 rpm for 5 min to facilitate precipitation of solids and phase separation of lipids.

### ***2.3.3. Clean-up by anion exchange and in-line coupled graphitized carbon SPE***

Diluted extracts (15 mL, solid material and lipids discarded) or sunflower oil (5 g) were transferred onto preconditioned [25] weak anion exchange (WAX) SPE cartridges at a rate of 1 drop/s. After loading, the cartridges were washed with 4 mL of 25 mM acetate buffer at pH 4 and 8 mL of a 50:50 (v/v) THF:acetonitrile mixture at a rate of 2 drop/s. Further cleaning was achieved by using larger volumes of THF:acetonitrile mixture (12 mL for vegetables and fruits, and 16 mL for sunflower oil). Then, the SPE WAX cartridge was coupled to the ENVI-carb cartridge via a suitable polyethylene (PE) adaptor cap and a volume of 6 mL of methanol containing 0.1% NH<sub>4</sub>OH passed through both SPE materials. Cartridges were dried under vacuum to ensure maximal recovery of the eluates, which were evaporated to dryness (50 °C, N<sub>2</sub>) and reconstituted with 250 µL of a mixture of 1:1 methanol and aqueous ammonium formate (6.3 mM, pH 4) containing a 5 ng mL<sup>-1</sup> concentration of injection ISs. Finally, the extracts were transferred to 1.5 mL PP Eppendorf tubes and centrifuged at 13.000 rpm for 10 min, after which a 200 µL aliquot of supernatant was transferred to a PP LC vial.

### ***2.3.4. Quantitation of PFCs by LC(ESI-)QQQ-MS<sup>2</sup>***

The target PFCs were separated and quantified by using LC coupled with an electrospray interface (ESI) operating in the negative ion mode prior to triple-quadrupole mass spectrometric detection. The injection volume used was 20 µL. The mobile phase consisted of 6.3 mM aqueous ammonium formate at pH 4 and methanol, and was passed at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The column temperature was set at 25 °C. The gradient elution program was 65% water during the first 2 min, a linear gradient from 65% to 5% water over the next 53 min and 100% methanol for another 10 min. Reconditioning the column took about 10 min. As recommended by the

supplier, the Fluorosep column was cleaned after each batch of runs. For this purpose, the column was flushed with water for 15 min to remove the buffer and then with a 30:70 THF:ACN (v/v) mixture for 2 h to remove highly hydrophobic compounds. The operating conditions for the ESI source were as follows: capillary voltage 1000 V, source temperature 325 °C, gas flow rate 6 L min<sup>-1</sup> and nebulizer gas pressure 25 psi. Table 1 shows the quantifier and qualifier ions coming from two selected transitions used for each target PFC, the internal standards together with their corresponding quantifier ions, and the associated values for the fragmentor voltage and collision energy. The quantifier and qualifier ions for taurodeoxycholate (a common interference for PFOS) are also given. The selected reaction monitoring transitions for each analyte and internal standard were acquired by using a dwell time of 0.02 s for each. Solvent based calibration curves were constructed from standard solutions containing the target PFCs at concentrations over the ranges stated in Table 2 and 5 ng mL<sup>-1</sup> concentrations of surrogate and injection ISs and were prepared by appropriate dilution of methanolic stock solutions with 1:1 methanol/aqueous ammonium formate (6.3 mM, pH 4). Instrument control, file acquisition and peak integration were done with the software Mass Hunter (Agilent). PFC concentrations in sample extracts (containing the surrogate IS at 5 ng mL<sup>-1</sup> that is added before extraction) were calculated from the calibration curve obtained by plotting the ratio of analyte peak area to surrogate IS peak area against the analyte concentration.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

---

### ***3.1. Control of background contamination***

One typical problem encountered in determining PFCs is background contamination arising from the presence of a variety of fluoropolymer materials in the components of LC equipment or labware [19,26]. Inlet solvent Teflon tubes were identified as the main source of contamination with PFCs (at the low ng mL<sup>-1</sup> level) in our LC system. Its effect, however,

was effectively suppressed by replacing the Teflon tubes with PEEK tubes. As a precautionary measure, an additional column (Water Symmetry 5  $\mu\text{m}$ , 2.1mm $\times$ 50mm) was inserted between the pump and injector in order to trap PFCs (mainly PFOA) released from the instrument. Contamination arising from labware was prevented by using disposable PP tubes, vials and pipettes. Eluates were evaporated with 99.999% pure nitrogen. No contaminating PFC was detected above its detection limit. In any case, appropriate blanks were routinely injected into the instrument during sample processing sequences in order to check for potential procedural or instrumental contamination.

### **3.2. Solvent extraction method**

Efficient extraction of amphiphilic molecules requires the use of solvents capable of establishing properly balanced polar and non-polar interactions. The hydrocarbon chains of PFCs in food usually contain 4–14 carbon atoms and are highly hydrophobic owing to the presence of fluorine. The polar groups in PFACs include hydrogen donors and acceptors, whereas those in PFASs include anions and hydrogen acceptors. It is difficult to obtain strong enough polar (hydrogen bonding, dipole–dipole) and non-polar (dispersive) interactions with all PFCs to ensure efficient extraction from food by using an individual solvent. A solvent mixture must thus be used instead.

In this work, we used mixtures of THF and water on the grounds of their substantial difference in solvation capability this being given by their different Hildebrand solubility parameter values ( $\delta_{\text{water}} = 23.3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ,  $\delta_{\text{THF}} = 9.5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ). The Hildebrand parameter ( $\delta_{\text{T}}$ ) provides a measure of the overall intermolecular forces resulting from the additive effect of dispersion ( $\delta_{\text{d}}$ ), dipole–dipole ( $\delta_{\text{p}}$ ) and hydrogen bonding ( $\delta_{\text{h}}$ ) forces. Individual values for these forces (Hansen parameters,  $\text{cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ) are easily available from the literature [24] and can be used to calculate fractional Teas parameters in order to construct a Teas diagram, i.e. a triangular plot that graphically represents the solubility of a solvent in terms of these three forces

[24]. Solvents spanning a wide range of solvation can be obtained simply by changing the composition of the THF:water mixture as shown in Figure 1B.

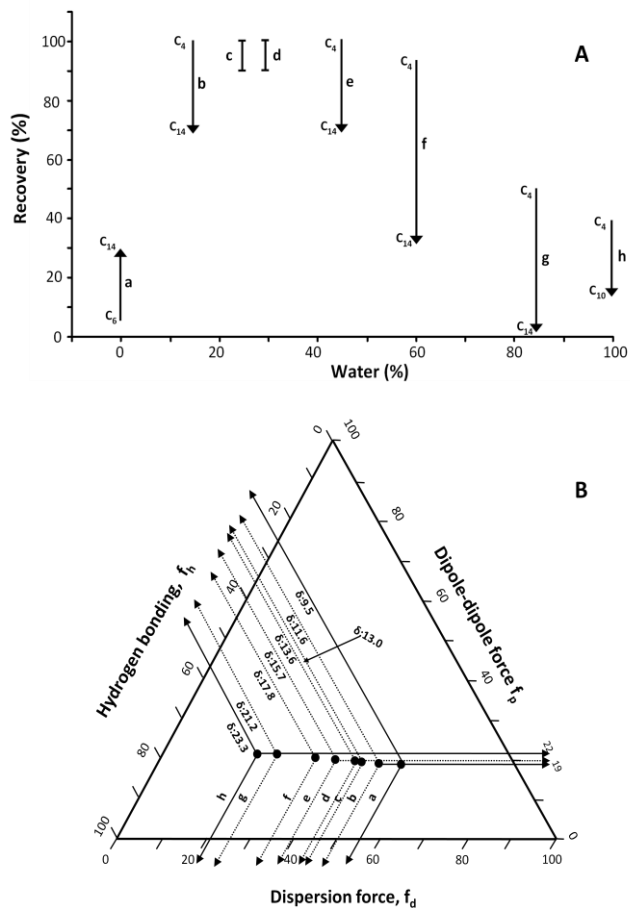


Figure 1

Figure 1. (A) Recovery ranges obtained by extracting of frozen-dried pangasius fillet samples (10 g, wet weight, blank material) fortified with C<sub>4</sub>–C<sub>14</sub> PFCs (10 ng g<sup>-1</sup> w.w.), using water:THF mixtures in variable (v/v) ratios: (a) 0:100, (b) 15:85, (c) 25:75, (d) 30:70, (e) 45:55, (f) 60:40, (g) 85:15 and (h) 0:100. (B) Teas graph showing the Hildebrand solubility ( $\delta$ ) and Hansen ( $f_d$ ,  $f_p$  and  $f_h$ ) parameters for each THF:water mixture

The ability of THF:water mixtures in v/v ratios from 100:0 to 0:100 to extract C<sub>4</sub>–C<sub>14</sub> PFACs and C<sub>4</sub>–C<sub>8</sub> PFASs from food was assessed by using freeze-dried pangasius fillet samples (10 g, wet weight, blank material) fortified with a 10 ng g<sup>-1</sup> concentration of target PFCs. After extraction, the target compounds were directly measured in the untreated solvent extract. Before development of the method was completed, matrix-matched calibration was used in all tests to ensure accurate quantitation. Figure 1A shows the PFC recoveries obtained with the different THF:water mixtures studied (solvent volume = 40 mL).

No extraction of the most polar (< C<sub>6</sub>) and non-polar (>C<sub>10</sub>) PFCs was achieved with water; also, the recoveries obtained with pure THF never exceeded 40% (Figs 1A,a,h). The balance between polar (dipole–dipole and hydrogen bonding) and non-polar (dispersion) forces for both solvents (Fig. 1B,a,h) resulted in inadequate solubilization of PFCs. The recoveries obtained with most of the solvent mixtures were strongly dependent on the length of the hydrocarbon chain of the PFCs (Fig. 1A,b,e,f,g), the lowest values invariably being those for the most hydrophobic compounds. Using a 75:25 (v/v) THF:water mixture (Fig. 1A,c) suppressed the dependence of recoveries on the PFC structure and raised them above 94%. Similar results were obtained with THF:water mixture compositions around the previous value (e.g. Fig. 1A,d).

Based on these results, the ideal solvent for extracting C<sub>4</sub>–C<sub>14</sub> PFCs is one with a Hildebrand parameter value around 12–14 (Fig. 1B); and Teas parameters with  $(f_h + f_p)/\text{non-polar } (f_d)$  force ratios of about 1.2. For example, a 25:75 mixture of water and THF has  $f_h = 34$ ,  $f_p = 20$  and  $f_d = 46$  (Fig. 1B,c). A solvent mixture consisting of 75:25 (v/v) THF:water was finally chosen as optimal for extraction.

Because water content varies among food types (e.g. ~70–75% for fish and meat, but ~90–95% for fruits and vegetables), obtaining quantitative recoveries and reproducible results entails freeze-drying food samples for analysis. The effectiveness of this procedure was assessed by freeze-drying 10



g (wet weight) of pangasius fillets fortified with a  $10 \text{ ng g}^{-1}$  concentration of target  $\text{C}_4\text{--C}_{14}$  PFACs and  $\text{C}_4\text{--C}_8$  PFASs for 24 h, and extracting the freeze-dried samples with 40 mL of 75:25 (v/v) THF:water. These tests were conducted in triplicate. The recoveries obtained from the freeze-dried samples exceeded 95% for all PFCs, and standard deviations were 2–5%. Therefore, freeze-drying the samples caused no PFC losses.

Since water is a major component of food and can be expected to influence the solvation behaviour of common solvents for PFC extraction (methanol, acetonitrile), it is advisable to estimate its influence via a Teas diagram; irrespective of the particular solvent used for extraction, freeze-dried samples can be expected to give more reproducible, less matrix-dependent results in PFC quantitation.

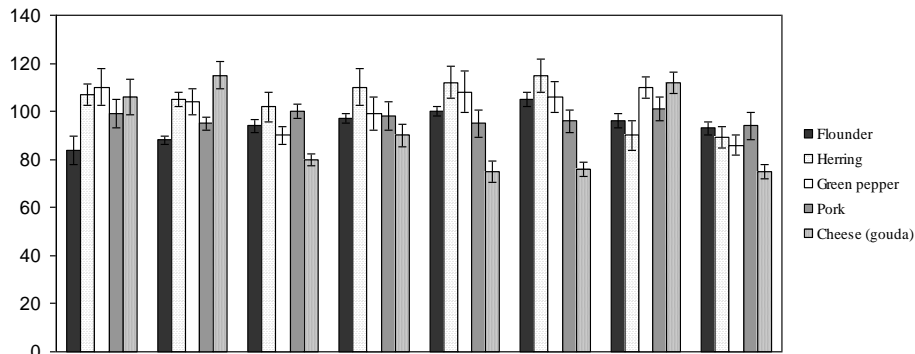
The optimal ratio of solvent volume to sample amount was determined by extracting a variety of foods containing variable proportions of proteins, carbohydrates and lipids (*e.g.* herring and flounder fillets, cheese, pork, green pepper and bread). Freeze-dried samples (10 g, wet weight, fortified with a  $10 \text{ ng g}^{-1}$  concentration of surrogate ISs) were extracted with 10, 20, 30 and 40 mL of 75:25 (v/v) THF:water in 50 mL PP tubes with shaking at 500 rpm for 10 min and subsequent centrifugation at 3500 rpm for 10 min. An aliquot of each extract was used for analysis. The recoveries thus obtained were independent of the solvent volume within the studied range. A 2:1 ratio of solvent (mL) to sample (g) was selected as optimal for most samples in order to be able to analyse an aliquot of the extract representing half the solvent volume used for extraction. Higher solvent (mL)/sample (g) ratios were selected for cheese and bread (4:1 and 3:1) owing to the high fat content of cheese ( $\sim 27\%$ )—which resulted in phase separation and precluded the use of a homogeneous solution at a 2:1 ratio—and the high porosity of bread, which hindered sample dispersion and solvent recovery after extraction.

**Table 1. Figures of merit of the quantitation of PFCs with the proposed method**

PFCs	Calibration range (ng mL <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> Coefficient of determination ( <i>r</i> <sup>2</sup> )	Retention time (min)	<sup>b</sup> Method LOQ (pg g <sup>-1</sup> )	<sup>b</sup> Method LOD (pg g <sup>-1</sup> )
<i>PFBA</i>	0.7–20	0.995	14.4	60	30
<i>PFBS</i>	0.7–20	0.994	25.0	50	25
<i>PFPeA</i>	0.7–20	0.994	25.7	60	30
<i>PFHxA</i>	0.05–30	0.995	33.1	15	5
<i>PFHxS</i>	0.5–20	0.996	36.6	25	10
<i>PFHpA</i>	0.05–20	0.993	38.7	15	5
<i>PFOA</i>	0.15–20	0.994	42.8	10	5
<i>PFOS</i>	0.05–20	0.997	43.8	3.5	2
<i>PFNA</i>	0.05–20	0.996	45.8	5	3
<i>PFDA</i>	0.05–20	0.997	47.8	5	3
<i>PFUdA</i>	0.15–20	0.998	49.2	10	5
<i>PFDoA</i>	0.025–20	0.998	50.4	2.5	1
<i>PFTrA</i>	0.025–20	0.997	51.6	2.5	1
<i>PFTeA</i>	0.025–20	0.993	52.8	2.5	1

<sup>a</sup> *n* = 8; <sup>b</sup> Calculated on the basis of 70% recovery for each PFCs (a “worst-case scenario”)

The influence of matrix components on PFC recoveries was investigated by extracting representative food samples fortified with a 10 ng g<sup>-1</sup> concentration of surrogate ISs. Figure 2 shows the results, as well as the extraction conditions. Matrix-matched calibration was used to correct recoveries for potential suppression or enhancement of IS ionization. As can be seen from Fig. 2, recoveries were matrix-independent and exceeded 85% in all samples except cheese, where they were around 75% for some ISs (*e.g.* <sup>13</sup>C<sub>4</sub>PFOA, <sup>13</sup>C<sub>2</sub>PFDA and <sup>13</sup>C<sub>2</sub>PFUdA). The high extraction efficiency of this method for PFCs spanning a wide polarity range in any type of food is one clear advantage over existing methods [11,20].



**Figure 2. Recoveries and standard deviations ( $n = 2$ ) obtained by extraction with 20 mL of 75:25 (v/v) THF:water of a variety of food samples (10 g, wet weight, and 2.5 g for Gouda cheese) fortified with method internal standards at a  $10 \text{ ng g}^{-1}$  concentration. Matrix-matched calibration was used to calculate recoveries**

The extraction method was validated by analysing flounder fillets previously used in the Second International Interlaboratory Study on PFCs [18] and containing the following concentrations of the target compounds, expressed as mean values and their standard deviations:  $18.0 \pm 4.1$ ,  $17.5 \pm 4.6$ ,  $21.1 \pm 4.6$ ,  $15.9 \pm 4.1$ ,  $17.3 \pm 5.2$  and  $150 \pm 44 \text{ ng g}^{-1}$  for PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA and PFOS, respectively. Sample aliquots (10 g, wet weight) were freeze-dried and spiked with the corresponding mass-labeled PFCs (see Table 1). The mean values and standard deviations thus obtained with the proposed method were  $18.5 \pm 0.8$ ,  $19.2 \pm 0.3$ ,  $21.7 \pm 0.3$ ,  $18.0 \pm 0.9$ ,  $21.9 \pm 0.8$  and  $166 \pm 7 \text{ ng g}^{-1}$  for PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA and PFOS, respectively. These results are all within the range of reported mean  $\pm$  s values for the reference material.

### 3.3. Sample clean-up and concentration

Individual or serial weak anion exchange (WAX) SPE and dispersive graphitized carbon are currently the most widely used clean-up choices for quantifying PFCs in food [11,20,21]. Because the amount of sample used for

analysis was 10 g, the use of both SPE materials was highly advisable in order to have clean enough sample extracts —and avoid MS signal suppression or ionization caused by matrix interferences and sensitivities at the  $\text{pg g}^{-1}$  level as a result. In this work, two serial clean-up steps involving WAX and graphitized carbon materials were applied to the THF:water extracts; investigations were intended for getting quantitative recovery of the target PFCs and simplify the overall procedure.

Similarly to the methanol extracts, dilution with water was required to obtain good recoveries [11,23]; in fact, direct filtration of 20 mL of the 75:25 (v/v) THF:water extracts through WAX SPE resulted in very low retention of PFCs (Table 3). Retention greatly improved by effect of partially or completely evaporating the THF in the extract with nitrogen at 50 °C and adding water to obtain a final THF:water volume of 20 mL —at this point, centrifugation was needed to remove matrix components which had thus been rendered insoluble. Table 3 shows the most salient results. Quantitative retention of PFCs on WAX was only achieved with THF proportions below 25%, which was thus chosen as optimal —evaporation of the required volume of THF took only around 5–10 min by virtue of the high volatility of the solvent. Retention of PFCs was also favored by filtering lower sample volumes [e.g. 10 mL of sample extract in 75:25 (v/v) THF:water], but was still inadequate for most PFCAs (Table 3). Samples of sunflower oil (5 g, fresh weight) were directly filtered through WAX SPE cartridges.

The cartridges were initially eluted with 4 mL of acetate buffer (25mM, pH 4), which is allegedly required to remove interfering biomolecules (lipids, proteins) and improve adsorption of the target anions [25], and then with 8 mL of a 50:50 (v/v) mixture of THF and acetonitrile. This hydrophobic solvent mixture ( $\epsilon_{\text{THF}} = 7.5$ ,  $\epsilon_{\text{ACN}} = 36$ ) proved more efficient than another commonly used solvent —methanol [11,25]— in removing highly hydrophobic compounds such as dyes or lipids, and rendered the PFC extracts less coloured. The low solubility of PFCs in pure THF and ACN —neither is a hydrogen donor, so neither can solubilize the typical anionic polar groups of PFCs— ensured the absence of PFC losses during the

washing step. In order to obtain cleaner extracts, a volume of THF:ACN mixture of 12 mL was used with vegetables and fruits; as a result, the internal standard recoveries for 13C8PFOA, 13C7PFUdA and 13C8PFOS from final orange sample extracts rose from 67%, 64% and 80% to 110%, 94% and 105%, respectively, as the amount of washing solvent was increased from 8 to 12 mL. A volume of 16 mL of solvent mixture was used for sunflower oil samples, which were subjected to no pretreatment.

**Table 2. Performance of the WAX SPE clean-up step as a function of the THF content of the sample extracts (expressed as recoveries of method ISs).**

THF (%)	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFBA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFHxA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFOA	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> PFNA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFDA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFUdA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFHxS	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFOS
75	6.4±0.2	4.8±0.6	2.3±0.2	1.9±0.1	1.51±0.04	1.3±0.1	5.9±0.4	1.5±0.4
35	90±4	97±4	85±14	87±18	79±25	75±31	96±4	94±2
25	103±6	99±3	95±5	102±5	99±3	102±4	97±4	98±2
15	100±4	99±1	105±3	105±6	104±5	102±3	95±4	105±3
7.5	107±7	100±3	101±4	105±1	103±1	102±2	105±1	105±5
0	108±6	98±3	95±2	98±4	90±5	89±5	100±3	91±4
<sup>a</sup> 75	91±5	50±7	44±7	36±6	33±6	28±7	76±20	73±17

Blank herring sample extract (20 mL, except <sup>a</sup>10 mL) fortified with a 20 ng g<sup>-1</sup> concentration of method IS PFCs before SPE; n = 3

Elution of PFCs from the WAX material with 4 mL of methanol containing 0.1% NH<sub>4</sub>OH was quantitative and independent of the particular food type; however, the most hydrophobic PFCs were strongly adsorbed to the insoluble matrix components produced during evaporation to dryness of the eluates and could not be completely recovered by reconstitution with 250 µL of a 50:50 (v/v) mixture of 6.3 mM ammonium formate and methanol; for example, salmon extracts exhibited losses of 50–60% for C13 and C14 acids. This led us to subject the extracts to additional clean-up with ENVI-carb as proposed by other authors elsewhere [11,12]. In order to simplify the clean-up procedure with ENVI-carb, which is usually applied in a dispersive

format [11,12,21] —and thus requires transfer and centrifugation of the extracts 2–4 times and causes the loss of some solvent as a result—, we chose to conduct this step with Supelclean ENVI-carb cartridges (6cc, 250 mg). The cartridges were previously conditioned with 4 mL of methanol and connected at the bottom with Oasis WAX cartridges through a suitable PE adaptor cap at the time of elution of PFCs —using 6 mL of methanol containing 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  is recommended to completely elute PFCs from both types of cartridges. The addition of acetic acid when using ENVI-carb [27] is recommended to avoid potential losses of anionic compounds by effect of the slightly basic nature of graphitized carbon. However, we checked that no losses of PFCs occurred in methanolic solutions containing 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (fortified with 5  $\text{ng mL}^{-1}$  concentrations of the PFCs) on passage thorough cartridges containing 250 mg of ENVI-carb. After elution, cartridges were vacuum-dried in order to maximize recovery of the eluate, which was evaporated to dryness (50 °C,  $\text{N}_2$ ) and reconstituted with 250  $\mu\text{L}$  of a mixture of aqueous 50:50 (v/v) ammonium formate (6.3 mM, pH4):methanol containing a 5  $\text{ng mL}^{-1}$  concentration of injection internal standards (Table 1). Ultracentrifugation of this extract is recommended because, although suitable for standard solutions, filtration causes losses of the most hydrophobic PFCs in some foods (e.g. around 20% for 13C2PFUdA in pork sample extracts passed through Waters GHP syringe filters, 0.2  $\mu\text{m}$ , 13 mm).

### **3.4. Total method recoveries**

The lack of mass-labeled homologs for some PFCs at the time of this study (namely for PFPeA, PFHpA, PFTrDA, PFTeA and PFBS) led us to examine the suitability of the proposed sample treatment for efficiently recovering the target PFCs throughout the procedure (extraction, WAX/ENVI-carb SPE, evaporation, reconstitution). Pangasius fillets samples—which were previously found to be free of detectable levels of PFCs; were fortified with target  $\text{C}_4$ – $\text{C}_{14}$  PFACs and  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$  and  $\text{C}_8$  PFASs at two different concentration levels (100 and 2000  $\text{pg g}^{-1}$ ) prior to freeze-

drying. The recoveries ranged from 88% to 110%, and their relative standard deviations from 5% to 10% ( $n = 3$ ). No significant differences in recovery between PFCs were found. This justifies using the recommended method ISs for PFCs having no commercially available mass-labeled homologs (Table 1 of Supplementary Data). The ability of the proposed sample treatment to effectively extract PFCs from a variety of foods was assessed by spiking representative samples of each of the major food groups (*viz.* fruit and vegetables, meat, fish, cereals and fat-rich foods) following freeze-drying with a  $125 \text{ pg g}^{-1}$  concentration of method ISs, and calculating the total method recoveries. Table 3 shows the results. Recoveries exceeded 80% for fruits and vegetables—spinach excepted, and also for meat, fish and cereals. Therefore, the proposed method is the first reported method capable of quantitatively recovering PFCs at the low picogram per gram level from a variety of foods. Recoveries were lower for PFACs in fat-rich foods, but were still above 60% in all instances. Losses of PFACs from these matrices occurred mainly in their extraction with the THF:water mixture (e.g. in the longest chain PFACs from cheese, Fig. 2) or during treatment with WAX/ENVI-carb SPE for oil directly subjected to SPE. The decreased recoveries for spinach were ascribed to matrix effects on the signals for the injection ISs. An increase in the volume of solvent used for the washing SPE WAX step (maybe up to 16mL as used for sunflower oil) could help to reduce matrix effects in this more complex matrix.

		Table 3. Method recoveries of the whole sample treatment (expressed as recovery $\pm$ <sup>a</sup> standard deviation for the method ISSs)							
		<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFBA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFHxA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFOA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFNA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFDA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> PFUdA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFHxS	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> PFOS
Fruits and vegetables	<i>Carrot</i>	111 $\pm$ 5	116 $\pm$ 2	82 $\pm$ 6	103 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6	90 $\pm$ 7	110 $\pm$ 13	97 $\pm$ 1
	<i>Spinach</i>	104 $\pm$ 8	61 $\pm$ 3	90 $\pm$ 6	78 $\pm$ 3	70 $\pm$ 5	72 $\pm$ 6	65 $\pm$ 5	70 $\pm$ 5
	<i>Apple</i>	111 $\pm$ 13	103 $\pm$ 7	98 $\pm$ 7	103 $\pm$ 5	96 $\pm$ 4	106 $\pm$ 8	120 $\pm$ 13	120 $\pm$ 12
	<i>Orange</i>	82 $\pm$ 9	93 $\pm$ 9	82 $\pm$ 4	82 $\pm$ 6	84 $\pm$ 6	82 $\pm$ 5	81 $\pm$ 4	81 $\pm$ 4
Meat	<i>Chicken</i>	102 $\pm$ 7	105 $\pm$ 5	97 $\pm$ 5	91 $\pm$ 6	89 $\pm$ 5	82 $\pm$ 4	115 $\pm$ 5	104 $\pm$ 6
	<i>Pork</i>	90 $\pm$ 8	94 $\pm$ 7	105 $\pm$ 4	93 $\pm$ 4	103 $\pm$ 7	97 $\pm$ 9	104 $\pm$ 7	111 $\pm$ 5
Fish	<i>Salmon</i>	104 $\pm$ 3	105 $\pm$ 3	102 $\pm$ 3	75 $\pm$ 3	70 $\pm$ 5	83 $\pm$ 3	105 $\pm$ 6	107 $\pm$ 1
	<i>Panga</i>	96 $\pm$ 7	92 $\pm$ 5	84 $\pm$ 4	90 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	89 $\pm$ 3	104 $\pm$ 1	111 $\pm$ 4
	<i>Herring</i>	100 $\pm$ 4	86 $\pm$ 4	78 $\pm$ 1	73 $\pm$ 6	77 $\pm$ 3	74 $\pm$ 3	106 $\pm$ 12	105 $\pm$ 12
Cereal	<i>Bread</i>	91 $\pm$ 10	110 $\pm$ 12	108 $\pm$ 9	100 $\pm$ 4	114 $\pm$ 7	108 $\pm$ 4	104 $\pm$ 6	100 $\pm$ 2
Fat-rich	<i>Cheese</i>	79 $\pm$ 4	69 $\pm$ 3	75 $\pm$ 4	76 $\pm$ 7	70 $\pm$ 7	67 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6	87 $\pm$ 5
	<i>Oil</i>	60 $\pm$ 2	63 $\pm$ 4	70 $\pm$ 5	73 $\pm$ 5	75 $\pm$ 4	74 $\pm$ 4	98 $\pm$ 7	89 $\pm$ 7

<sup>a</sup> Standard deviation ( $n = 2$ )

### 3.5. Analytical performance

#### 3.5.1. Sensitivity

Table 1 lists the analytical figures of merit of the proposed method. The instrumental limits of quantitation (LOQs) and detection (LODs) were calculated from 50:50 (v/v) MeOH:aqueous ammonium formate (6.3mM, pH 4) blanks containing a 5 ng mL<sup>-1</sup> concentration of method and injection ISSs at a signal-to-noise ratio of 10 and 3, respectively. The LOQs and LODs



were 0.7 and 0.5 ng mL<sup>-1</sup> for short-chain PFCs (PFBA, PFPeA and PFBS); 0.025 and 0.01 ng mL<sup>-1</sup> for long-chain acids (PFDoA, PFTrA and PFTeA); and 0.05 and 0.02 ng mL<sup>-1</sup> for all other compounds except PFOA and PFUdA (LOQ = 0.2 ng mL<sup>-1</sup>, LOD= 0.12 ng mL<sup>-1</sup>) and PFHxS (LOQ = 0.5 ng mL<sup>-1</sup>, LOD= 0.3 ng mL<sup>-1</sup>). The increased LODs and LOQs for the latter compounds were a result of their presence as impurities in proportions below 1% in the mass-labeled reagents used as internal standards and could be improved by decreasing the amount of ISs added to samples. Method LOQs and LODs were calculated on the basis of sample blanks taking into account a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively, and the concentration factor obtained with the method. Carrot, orange, pork, bread and sunflower oil sample extracts were used for this purpose. No significant differences in background noise between matrices were observed. This led us to adopt general LOQs and LODs for all types of foods based on worst-case calculations assuming 70% total average recovery for each PFC for the concentration factor since total method recoveries ranged from about 60–120% in all samples. Table 1 shows the estimated LOQs and LODs, which are the lowest reported so far to the best of our knowledge for this type of determination [11,12,20]. Values of LOQs and LODs for cheese are four times higher due to the use of a smaller sample size (2.5 g). A smaller volume of solvent at reconstitution step could be used to compensate this loss.

### **3.5.2. Selectivity**

PFC quantitation is reportedly subject to substantial matrix effects even after thorough SPE clean-up [11,12,20]. Such effects, which result from co-eluting matrix components, are compound- and food type-dependent, and may cause signal enhancement or suppression, or even PFAS peak misidentification by effect of mass interferences in samples of animal origin. The effect of these interferences on the quantitation of PFCs with the proposed method were investigated in depth by using both the proposed column (Fluorosep RP Octyl), which provides selective retention, and the most widely used stationary phase (C<sub>18</sub>).

Signal enhancement or suppression was estimated by comparing the response for injection ISs ( $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) in the final reconstituted extracts with the average response of these standards in the calibration solutions on the assumption that signal changes due to instrument fluctuations would be negligible. Table 5 shows the results, expressed as recoveries for the three injection ISs and two stationary phases used. Most of the samples analysed with the Fluorosep column ( $\sim 85\%$ ) exhibited little signal suppression or enhancement ( $\leq 10\%$ ); the greatest effects in this respect were those on  $^{13}\text{C}_8$  PFOS in spinach (25% suppression) and  $^{13}\text{C}_7$  PFUDA in bread (15% enhancement). Matrix effects were generally more marked with the  $\text{C}_{18}$  column; thus, signal suppression was 36% and 57% for  $^{13}\text{C}_8$  PFOA in spinach and herring, respectively, and 37% for  $^{13}\text{C}_8$  PFOS in spinach, whereas signal enhancement amounted to 40% for  $^{13}\text{C}_8$  PFOS in apple and cheese. Therefore, the combination of the proposed sample treatment and the selective chromatographic retention mechanism for PFCs is effective towards preventing signal enhancement or suppression by co-eluting matrix components.

Overestimating the proportion of PFOS by misreporting co-eluting cholic acids is a major problem here and continues to detract from accuracy in the determination of PFCs in samples of animal origin. For example, taurodihydroxycholate bile salts, which contain a sulfonate group, have been found to co-elute with PFOS from  $\text{C}_{18}$  columns [22,28,29]. The mass of these compounds (498.2968) is not different enough from that of PFOS (498.9297) and compromise accuracy in their QQQ tandem mass spectrometry determination; therefore, co-elution, especially in the presence of high levels of the interferents, can lead to overestimation at the 499–80 transition. This problem has been addressed in various ways including the use of other column types providing more selective retention mechanisms (*e.g.* perfluorooctyl [20] or a ion-exchange phase column [29]), the use of a more selective—but also less sensitive—transition (the 499–99 transition, mainly [11]) or that of time-of-flight (TOF) mass spectrometry, which affords accurate mass discrimination between PFOS and interferents [20].

PFOS peak misidentification was investigated by analysing a number of samples ( $n = 10$ ) of animal origin including muscle meat from pork and chicken, and fish fillets from herring, salmon and pangasius, all of which were fortified with a  $125 \text{ pg g}^{-1}$  concentration of surrogate ISs. To this end, the chromatographic separation of PFOS and taurodeoxycholate (TDC) on the Fluorosep column was optimized, the retention times being 43.8 and 38.0 min, respectively. Although the  $C_{18}$  column also provided well-resolved peaks for the TDC reagent (37 min) and PFOS (36 min), taurodihydroxycholate bile salt isomers commonly present in these samples, and co-elute with PFOS. Characteristic transitions for TDC (498.3–80, 498.3–107 and 498.3–124) were also optimized, the fragmentor voltage and collision energy values being quite different from those used for PFOS (see Table 1); this rendered TDC undetected at the 499–80 transition used to quantify PFOS at concentrations below  $\sim 100 \text{ ng mL}^{-1}$  (equivalent to  $5 \text{ ng g}^{-1}$  in the samples at an arbitrary extraction efficiency of 100% for TDC). This had no effect on the Fluorosep column, but increased the tolerance of TCD by the  $C_{18}$  columns.

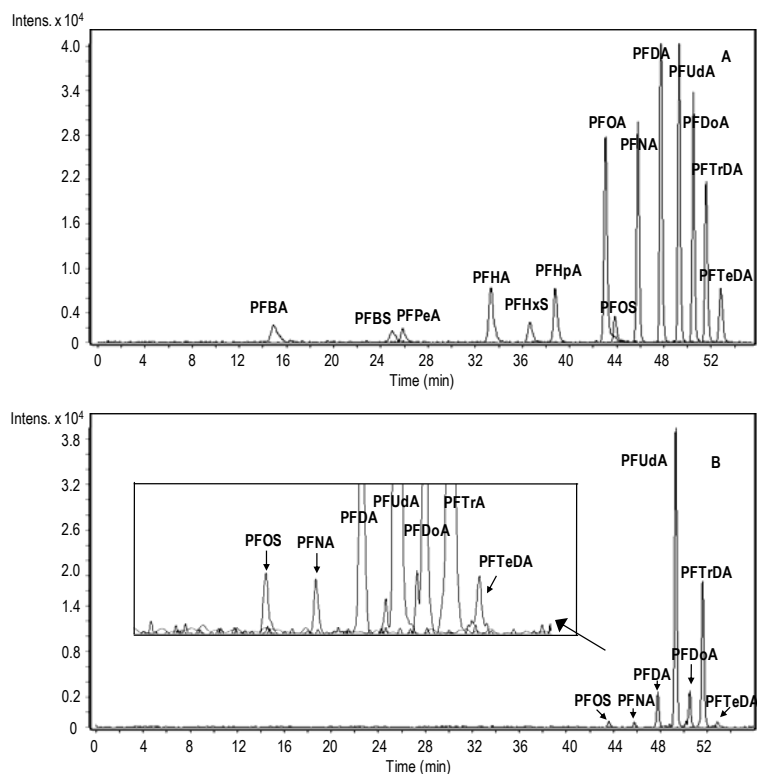
TCD was present in all meat (chicken and pork) and fish samples (herring, salmon and pangasius), its estimated concentrations in them ranging from 2.5 to  $350 \text{ ng g}^{-1}$ . Quantifying PFOS with the Fluorosep column (499–80 transition) provided concentrations of  $57 \pm 5$  and  $16 \pm 1 \text{ pg g}^{-1}$  in herring and salmon, respectively, but undetectable levels in the other samples. These values are consistent with those obtained by using the  $C_{18}$  column with the 499–99 selective transition, namely: *viz.*  $61 \pm 6$  and  $14 \pm 1 \text{ pg g}^{-1}$  for herring and salmon, respectively, and undetectable levels for the other samples. However, using the more sensitive 499–80 transition provided PFOS concentrations of  $251 \pm 50$ ,  $17 \pm 1$  and  $33 \pm 2 \text{ pg g}^{-1}$  in herring, salmon and chicken, respectively, thus revealing that TCD concentrations above  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  in the extracts led to PFOS overestimation ( $\sim 440\%$  in herring) and misidentification (*e.g.* in chicken) with the  $C_{18}$  column. Although both the Fluorosep column and the  $C_{18}$  column can be used to quantify PFOS with accuracy, use of the former is recommended because it affords measurement at the 499–80 transition, which is more sensitive than the 499–99 transition.

By way of example, Fig. 1 of Supplementary Data shows the chromatographic peaks for the cholic acid, PFOS and the surrogate IS  $^{13}\text{C}_4$  PFOS in the herring sample as obtained with the two columns. As can be seen, the cholic acid signal at the transition of interest for PFOS (499–80) was rather low and the measurement of PFOS with the  $\text{C}_{18}$  column was interfered with by this transition.

### 3.6. Analysis of food samples

The proposed method was used to analyse a variety of food samples ( $n = 12$ ) including fish (herring, pangasius and salmon) and meat (pork and chicken) muscle fillets, whole-grain bread, vegetables (spinach and carrot), fruits (orange and apple), cheese (Gouda) and sunflower oil, all in duplicate.

Fig. 3 shows the selected ion chromatograms for PFCs extracted from (A) a standard solution containing a  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  concentration and (B) a salmon muscle sample. Only three samples (25% of the foods studied) were found to be contaminated with PFCs (salmon, herring and spinach). Among PFASs, only PFOS was present in 633 fish (at  $57 \pm 5 \text{ pg g}^{-1}$  in herring and  $16 \pm 1 \text{ pg g}^{-1}$  in salmon); also, PFHxS was detected in spinach, albeit at levels below its LOQ. As noted earlier, PFOS was clearly distinguished from the bile salts present in fish. Long-chain PFACs were present in fish, which confirms that bioaccumulation of these compounds involves mainly those with the longest carbon chains [30] and the need for simple methods to quantify C12–C14 PFACs. The concentrations found were  $27 \pm 2$ ,  $7.7 \pm 0.5$ ,  $31 \pm 2$ ,  $11.3 \pm 0.5$  and  $27 \pm 6 \text{ pg g}^{-1}$  for PFOA, PFNA, PFUdA, PFDoA and PFTrDA, respectively, in herring; and  $642$   $5.6 \pm 0.6$ ,  $10.3 \pm 0.7$ ,  $75 \pm 4$ ,  $16 \pm 1$ ,  $31.3 \pm 2$  and  $4.5 \pm 0.6 \text{ pg g}^{-1}$  for PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA, PFTrDA and PFTeDA, respectively, in salmon. Spinach samples, which were bought packaged, were also contaminated with PFACs: PFHpA at  $8.8 \pm 0.4 \text{ pg g}^{-1}$  and PFOA at  $646$   $31 \pm 2 \text{ pg g}^{-1}$ . PFC contamination in packaged lettuce was previously reported by other authors [12]. Transfer from soil to crops [31] is a possible source of contamination with PFCs in these foods.



**Figura 3. LC-ESI-MS/MS selected ion chromatograms for PFCs extracted from (A) a standard solution containing a 1 ng mL<sup>-1</sup> concentration and (B) a salmon muscle sample**

In addition, contamination may also originate from processing the foods (e.g. washing) and packaging. The generally low levels of PFCs found in this study are consistent with previous results of other authors [9,11,12].

---

## 4. CONCLUSIONS

---

The following method is proposed for PFCs in food: freeze drying of the samples; extraction using THF–water 75:25%; SPE enrichment and clean-up using combined Oasis WAX and graphitised carbon followed by LC–ESI–MS/MS using a fluorinated stationary phase column. The main assets of the proposed method for determining PFCs in a variety of dietary foods include (a) very low detection limits (1–5 pg g<sup>-1</sup> except for C4 and C5 PFCs), which should enable accurate estimation of current food contamination levels; (b) the ability to quantitatively extract PFCs spanning a wider polarity range (C4–C14) relative to most existing methods (C6–C12); (c) the matrix-independence of recoveries for a variety of samples (lipid-, protein- and carbohydrate-rich food) by effect of the high extraction efficiency and minimal matrix effects—a result of a smart combination of efficient extraction and clean-up with the use of a highly selective perfluorooctyl phase column for PFC separation; and (d) a high accuracy and precision.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge funding from Spain's MCyT (Project CTQ2008-01068), from the EU (research project PERFOOD, ref. nr. 227525) and from the Dutch Food and Consumer Product Safety Authority (VWA, Office for Risk Assessment). A. Ballesteros-Gómez is also grateful to Spain's MEC for award of a doctoral fellowship (Grant AP2005-4275) which covered a short stay at the VU University of Amsterdam to conduct this research.

## REFERENCES

- [1] H. Fromme, A. Tittlemier, W. Völkel, M. Wilhelm, D. Twardella, D. Int. J. Hyg. Environ. Health 212 (2009) 239.
- [2] A. Karrman, B. Van Bavel, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom, Chemosphere 64 (2006) 1582.

- [3] A.M. Calafat, L.L. Needham, Z. Kuklennyik, J.A. Reidy, J.S. Tully, M. Aguilar-Villalobos, *Chemosphere* 63 (2006) 490.
- [4] European Union (EU), Directive 2006/122/ECOF of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006, *Off. J. Europ. Union*, L/372/32-34, 2006 December.
- [5] Government of Canada, Perfluorooctane sulfonate and its salts and certain other compounds regulations, *Can. Gazette Pt. 1* 140 (50) 4265, 2006.
- [6] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Hazard assesment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts, Report number: ENV/JM/RD(2002)17/FINAL, 2002.
- [7] Du Pont, Du Pont Progress Report on PFOA Phase Out, Available at: [http://www2.dupont.com/PFOA2/enUS/assets/downloads/pdf/PFOAProgress\\_Report20081212.pdf](http://www2.dupont.com/PFOA2/enUS/assets/downloads/pdf/PFOAProgress_Report20081212.pdf) 2008 (accessed 11.03.10).
- [8] N. Kudo, E. Suzuki, M. Katakura, K. Ohmori, R. Noshiro, Y. Kawashima, *Chem. -Biol. Interact.* 134 (2001) 203.
- [9] FSA (Food Standard Agency), Fluorinated chemicals: UK dietary intakes, Food Survey Information Sheet 11/06, London, UK, 2006.
- [10] S.A. Tittlemier, K. Pepper, C. Seymour, J. Moisey, R. Bronson, X.-L. Cao, R.W. Dabeka, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3203.
- [11] I. Ericson, R. Martí-Cid, M. Nadal, B. Van Bavel, G. Lindström, J.L. Domingo, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1787.
- [12] I. Ericson Jogsten, G. Perelló, X. Llebaria, E. Bigas, R. Martí-Cid, A. Kärman, J.L. Domingo, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 1577.
- [13] H. Fromme, M. Schlummer, A. Möller, A.L. Gruber, G. Wolz, J. Ungewib, S. Böhmer, W. Dekant, R. Mayer, B. Liebl, D. Twardella, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7928.
- [14] Food Standards Agency (FSA), Survey of fluorinated chemicals in food, October, 2009, Food survey information sheet number 05/09, Available at:

<http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsisbranch2009/> (accessed 11.03.10).

[15] 3M, Analysis of PFOS, FOXA, and PFOA from various food matrices using HPLC electrospray/mass spectrometry. 3M Study conducted by Centre Analytical Laboratories, Inc., 2001.

[16] EFSA (European Food Safety Authority), *EFSA J.* (1) 653, 2008.

[17] S.P.J. van Leeuwen, A. Karrman, B. van Bavel, J. de Boer, G. Lindstrom, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7854.

[18] S.P.J. van Leeuwen, K. Swart, I. van der Veen, J. de Boer, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 401.

[19] J.W. Martin, K. Kannan, U. Berger, P. de Voogt, J. Field, J. Franklin, J.P. Giesy, T. Harner, D.C.G. Muir, B. Scott, M. Kaiser, U. Jarnberg, K.C. Jones, S.A. Mabury, H. Schroeder, M. Simcik, C. Sottani, B. van Bavel, A. Karrman, G. Lindstrom, S. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 248A.

[20] A.S. Lloyd, V.A. Bailey, S.J. Hird, A. Routledge, D.B. Clarke, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2923.

[21] P. de Voogt, F.W.M. van der Wielen, J. Westerveld, W. D'Hollander, L. Bervoets, *Organohalogen Compd.* 70 (2008) 714.

[22] J.P. Benskin, M. Bataineh, J.W. Martin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6455.

[23] E. Chan, M. Sandhu, J.P. Benskin, M. Ralitsch, N. Thibault, D. Birkholz, J.W. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1405.

[24] J. Burke, in: B. Kanegsberg, E. Kanegsberg (Eds.), *Handbook for Critical Cleaning*, CRC Press, New York, 2000, p. 21.

[25] S. Taniyasu, K. Kannan, M.K. So, A. Gulkowska, E. Sinclair, T. Okazawa, N.J. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 89.

[26] N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Hori, G. Petrick, T. Gamo, *Mar. Pollut. Bull.* 51 (2005) 658.

[27] C.R. Powley, S.W. George, T.W. Ryan, R.C. Buck, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6353.



- [28] K. Kannan, J.C. Franson, W.W. Bowerman, K.J. Hansen, J.D. Jones, J.P. Giesy, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3065.
- [29] L.W.Y. Yeung, S. Taniyasu, K. Kannan, D.Z.Y. Xu, K.S. Guruge, P.K.S. Lam, N.J. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4950.
- [30] J.M. Conder, R.A. Hoke, W. Wolf, M.H. Russell, R.C. Buck, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 995.
- [31] T. Stahl, J. Heyn, H. Thiele, J. Hüther, K. Failing, S. Georgii, H. Brunn, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57 (2009) 289.

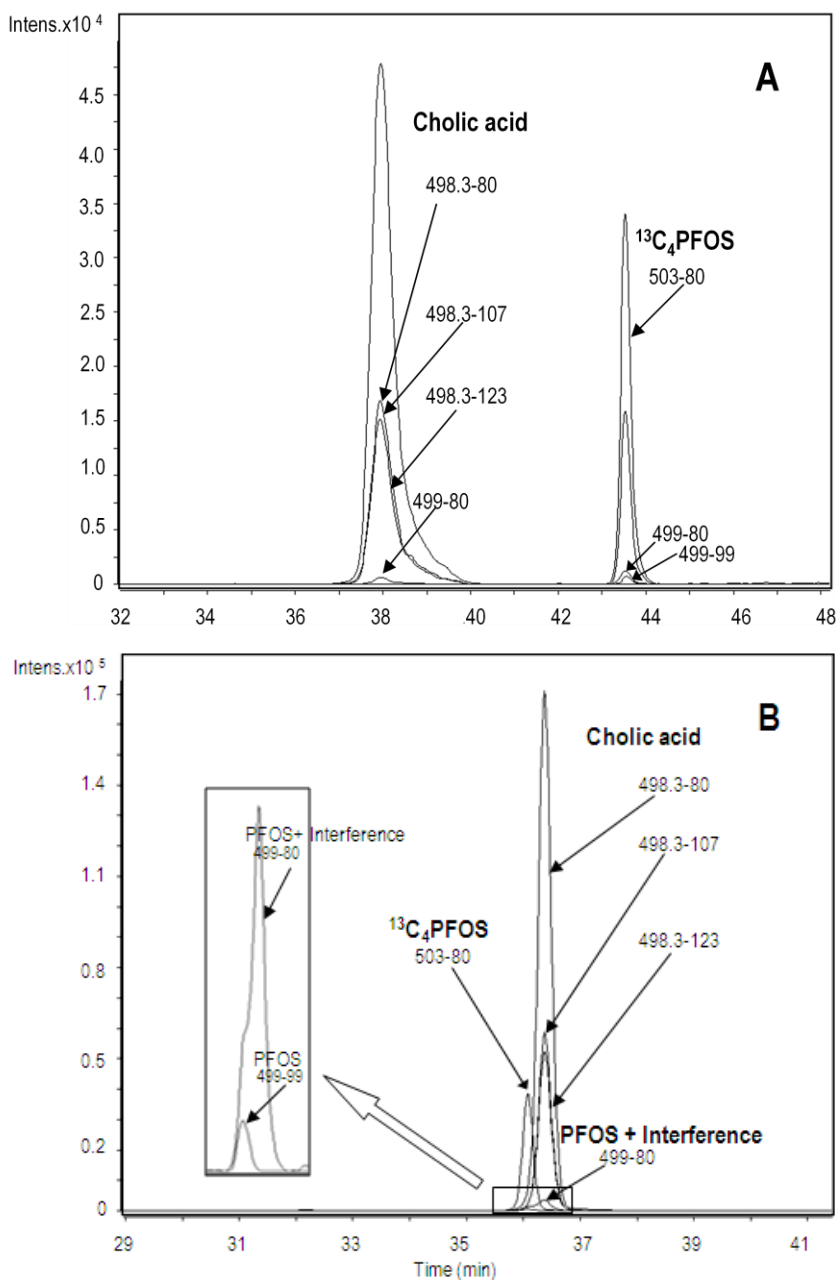
## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Table SD1. Quantifier and qualifier ion transitions, and MS parameters, used to determine PFCs in foods							
Target compound	Internal standards (ISs)		<sup>a</sup> F (V)	<sup>b</sup> CE (V)			
	Quantifier	Qualifier			Method ISs	Injection ISs	
PFBA	213–169	–	13C4 PFBA	217– 172			60 3
PFBS	299–80	299–99	18O2 PFHxS	403– 84			150 35
PFPeA	263–219	–	13C4 PFBA	217– 172			60 3
PFHxA	313–269	313–119	13C2 PFHxA	315– 270			80 4
PFHxS	399–80	399–99	18O2 PFHxS	403– 84			150 45
PFHpA	363–319	363–169	13C2 PFHxA	315– 270			80 4
PFOA	413–369	413–169	13C4 PFOA	417– 372	13C8 PFOA	421– 376	80 4
PFOS	499–80	499–99	13C4 PFOS	503– 80	13C8 PFOS	507– 80	200 48
PFNA	463–419	463–219	13C5 PFNA	468– 423			100 5
PFDA	513–469	513–219	13C2 PFDA	515– 470			100 5
PFUdA	563–519	563–269	13C2 PFUdA	565– 520	13C7 PFUdA	570– 525	100 6
PFDoA	613–569	613–319	13C2 PFUdA	565– 520			100 7
PFTTrA	663–619	–	13C2 PFUdA	565– 520			100 7
PFTeA	713–669	713–369	13C2 PFUdA	565– 520			100 4
<sup>c</sup> TDC	498.3–107	498.3– 124	–				290 65

PFCA precursor ion [M–H]<sup>–</sup>, quantifier product ion [M–COOH]<sup>–</sup>  
 PFSA precursor ion [M–K]<sup>–</sup>, quantifier product ion [SO<sub>3</sub>]<sup>–</sup>  
<sup>a</sup>Fragmentor, <sup>b</sup>Collision Energy, <sup>c</sup>PFOS interference

<b>Table SD2. Recovery<sup>a</sup> of injection internal standards in different foods using the C<sub>18</sub> and Fluorosep columns</b>				
		<sup>13</sup> C <sub>8</sub> PFOA	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> PFOS	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> PFUDa
<b>Fruits and vegetables</b>	<i>Carrot</i>	76/99	117/95	82/84
	<i>Spinach</i>	64/93	63/75	90/85
	<i>Apple</i>	98/100	140/108	109/102
	<i>Orange</i>	110/110	94/109	105/93
<b>Meat</b>	<i>Chicken</i>	114/110	115/113	117/109
	<i>Pork</i>	104/106	92/106	114/97
	<i>Salmon</i>	106/106	112/100	92/92
<b>Fish</b>	<i>Panga</i>	105/103	113/110	112/114
	<i>Herring</i>	43/102	100/110	101/101
<b>Cereal</b>	<i>Bread</i>	112/109	92/95	115/115
	<i>Cheese</i>	88/92	140/110	82/89
<b>Fat-rich</b>	<i>Oil</i>	105/110	101/100	103/105

<sup>a</sup> Standard deviation (*n* = 2)



**Supplementary data Figure 1.** LC-ESI-MS/MS selected ion chromatograms for PFOS, TDCA, PFOS and the surrogate IS  $^{13}\text{C}_4$  PFOS ( $125 \text{ pg g}^{-1}$ ) used in the analysis of herring fillet samples with (A) a Fluorosep RP Octyl column and (B) a C18 column.





# BLOQUE II

*Diseño, síntesis y estudio de nuevos  
disolventes y adsorbentes  
supramoleculares*

## **1. OBJETO**

---

En la última década se han realizado considerables avances en el desarrollo de disolventes y adsorbentes supramoleculares para su uso en procesos de extracción analíticos. Sin embargo, debido a la naturaleza espontánea, reversible y compleja de los procesos de autoensamblaje es difícil predecir y controlar las rutas de síntesis. Por otro lado, la integridad de la micro- o nanoestructura de estos sistemas depende de las condiciones ambientales en la que se produce el autoensamblaje, con lo cual son difíciles de caracterizar sin que el propio proceso de preparación de la muestra altere la estructura. Como consecuencia el desarrollo de nuevos disolventes y adsorbentes con propiedades programadas no se ha explorado y, hasta la fecha, el desarrollo de extracciones analíticas se ha llevado a cabo de modo básicamente empírico. En este segundo bloque de la tesis doctoral se aborda el diseño, síntesis y estudio de nuevos disolventes y adsorbentes supramoleculares dotados de propiedades relevantes para los procesos de extracción y se utilizan diversas técnicas (principalmente microscopía) para dilucidar la estructura de los mismos. Las propiedades seleccionadas para la producción de estos materiales han sido dos:

1. *Tamaño y composición programable de los agregados formados en los disolventes supramoleculares* con objeto de conferir selectividad a los procesos de extracción. La composición y microestructura de los SUPRASs es modificable en función de las de la naturaleza del anfililo y de las condiciones experimentales de coacervación que dirigen el auto-ensamblaje. Definir, predecir y controlar estas características estructurales y de composición permitiría disponer de una variedad de SUPRASs con propiedades extractantes diferentes que serían seleccionados en función de su idoneidad para cada aplicación. El hecho de disponer de SUPRASs con características reversibles en función de las condiciones ambientales permitiría avanzar en el desarrollo de materiales adaptativos.

2. Irreversibilidad de los agregados y propiedades magnéticas en los adsorbentes supramoleculares con el objetivo de producir extractos libres de tensioactivo y facilitar el procedimiento de SPE en formato disperso.

Con el fin de conseguir estos dos objetivos se han diseñado y desarrollado dos nuevos sistemas supramoleculares; disolventes supramoleculares formados por micelas inversas de alcoholes alifáticos de cadena larga (C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>) en mezclas de tetrahidrofurano y agua y adsorbentes supramoleculares formados por hemimicelas de alquilcarboxilatos quimiadsorbidas sobre nanopartículas magnéticas.

## 2. MICROESTRUCTURA DE LOS SUPRASs

---

La estructura de los disolventes supramoleculares es difícil de caracterizar debido a la alta concentración de anfifilo y la posible alteración de la muestra durante su tratamiento previo al análisis microscópico (procesos de dilución, tinción, secado, etc.).

Las técnicas de microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy, SEM*) y transmisión (*transmission electron microscopy, TEM*) se han utilizado ampliamente en la caracterización estructural de los SUPRASs. Estas técnicas nos permiten discriminar tamaños, formas y distribución de los agregados a una escala nanométrica en cuanto a la estructura superficial (*SEM*) o interna (*TEM*). Aunque la resolución de la microscopía óptica es mucho menor ( $\sim 0.2 \mu\text{m}$ ), permite una observación directa sin manipulación de la muestra y puede resultar muy útil cuando los tamaños de los agregados son los suficientemente grandes.

En cuanto a la microscopía electrónica, las técnicas más recientes de criofractura (*freeze-fracture*) o microscopía electrónica criogénica (*Cryo-TEM* o *Cryo-SEM*), son especialmente adecuadas para la caracterización de nano- o microestructuras autoensambladas. Estas técnicas se basan en una criofijación de la muestra, es decir, una rápida vitrificación a temperaturas



criogénicas (normalmente en etano o nitrógeno líquido), para evitar la formación de cristales de hielo. La muestra se vitrifica en la forma de una película delgada (en el caso de la microscopía electrónica criogénica) o de una columna de líquido (en el caso de la criofractura) y se introduce rápidamente en una cámara de alto vacío, donde en el caso de la criofractura se somete a una ruptura mecánica dejando una superficie de fractura. Después, normalmente, se sube la temperatura a  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se deja sublimar algo de hielo durante unos minutos. Finalmente la muestra se recubre con una fina película metálica (p. ej. Pt o Au) para crear una réplica. De este modo las estructuras observadas son estables al alto vacío de operación (normalmente  $\sim 10^{-5}\text{ Pa}$ ) y se evita la alteración que conllevan las técnicas convencionales de tinción y secado.

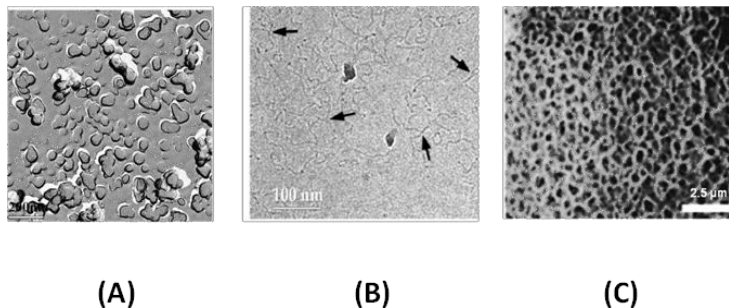
La bibliografía relativa a la caracterización estructural de los SUPRASs es limitada, aunque se han descrito una variedad de micro-o nanoestructuras que varían en función de la naturaleza del anfifilo y del agente coacervante o en función de la concentración inicial de estos componentes. Así, para un SUPRAS formado por una mezcla de un tensioactivo catiónico tipo gemini (dimérico) y un aniónico (SDS) e inducido por sal, se observaron fases vesiculares globulares (figura 2.a, A) o fases mixtas lamelares y vesiculares en función de las concentraciones de los componentes<sup>1</sup>. Por otro lado, para SUPRASs constituidos por tensioactivos no iónicos del tipo  $C_nE_m$  ( $m$ : número de unidades etoxiladas) e inducidos por temperatura, se han observado micelas esféricas que pasan a ser cilíndricas (*rod-like*) a temperaturas más altas (figura 2.a, B) debido a la mayor desolvatación y, como consecuencia, agregación de las mismas<sup>2</sup>. Por último, también se han descrito microestructuras del tipo “esponja”, es decir, una fase bicontinua formada por bicapas de tensioactivo interconectadas y agua ocupando los “poros”. Este es el caso de un SUPRAS formado por un tensioactivo zwitteriónico tipo gemini (Figura 2.a, C)<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> L.-S. Hao, Y.-Q. Nan, *Colloids Surf.*, A 325 (2008) 186.

<sup>2</sup> A. Bernheim-Groswasser, E. Wachtel, Y. Talmon, *Langmuir* 16 (2000) 4131.

<sup>3</sup> F.M. Menger, A.V. Peresyphkin, K. L. Caran, R.P. Apkarian, *Langmuir* 16 (2000) 9116.



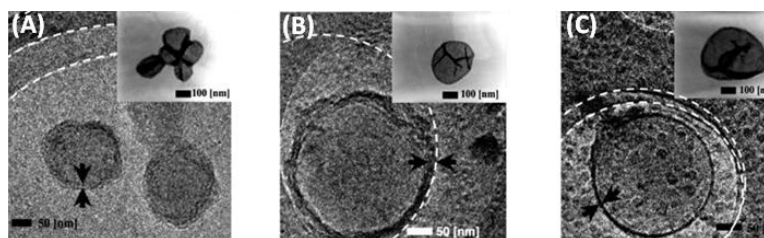
**Figura 2.a. Diferentes estructuras en SUPRASs: A) imagen de microscopía electrónica de transmisión con criofractura (*freeze-fracture-TEM*) de un SUPRAS mixto de dodecilsulfato sódico (SDS) y un tensioactivo tipo gemini [propileno bis(dodecildimetilamonio bromuro) mostrando glóbulos correspondientes a una fase isotrópica vesicular; B) imagen de criomicroscopía electrónica de transmisión (*Cryo-TEM*) de un SUPRAS de  $C_{12}E_5$  mostrando micelas cilíndricas; C) imagen de criomicroscopía electrónica de barrido (*Cryo-SEM*) de un SUPRASs formado por un tensioactivo zwitteriónico tipo gemini mostrando una morfología de “esponja”.**

El control del tamaño de los agregados (generalmente de tipo esférico) en disolución se ha investigado extensamente en los últimos años por sus potenciales aplicaciones como medios de reacción, para el encapsulamiento o transporte de fármacos, o como medios para fabricar nanopartículas de tamaño definido. La formación de agregados de tamaño definido a través del autoensamblaje ofrece una alternativa simple de síntesis que se ha utilizado especialmente para la síntesis de estructuras con cierto grado de complejidad como micelas y vesículas poliméricas<sup>4,5,6</sup>. En la figura 2.b se muestran vesículas formadas por una mezcla de aniómeros y catiónicos poliméricos que adoptan diferentes tamaños en función de la concentración inicial de polímero.

<sup>4</sup> R. K. O'Reilly, Phil. Trans. R. Soc. A, 365 (2007) 2863.

<sup>5</sup> J. R. Howse, R.A.L. Jones, G. Battaglia, R. E. Ducker, G.J.Leggett, A.J.Ryan, Nature Materials, 8 (2009) 507.

<sup>6</sup> Y. Anraku, A. Kishimura, M. Oba, Y. Yamasaki, K. Kataoka, J. Am.Chem. Soc., 132 (2010) 1631.



**Figura 2.b.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión criogénica y convencional (imágenes insertadas) que muestran el incremento del tamaño de las vesículas poliméricas complejas poliónicas (*polyion complex vesicles, PIC*) al incrementar la concentración de polímero a A) 2ng/mL, B) 5ng/mL y C) 10 ng/mL.

También se han propuesto algunas metodologías para el control de tamaños de vesículas de compuestos anfífilos simples a través del auto-ensamblaje. Por ejemplo, para vesículas de lecitina de huevo, se ha usado como agente controlador del tamaño un hidrótopo, que determina la curvatura de la bicapa y por tanto el tamaño de la vesícula<sup>7</sup>.

### 3. COMPOSICIÓN DE LOS SUPRAS<sub>s</sub>

---

La composición del disolvente supramolecular depende de la naturaleza del anfífilo y de las condiciones experimentales de coacervación (como la presencia de sales o la temperatura) que dirigen el auto-ensamblaje. Así, un estudio detallado de la composición del SUPRAS en un intervalo de condiciones experimentales permite definir y predecir una variedad de extractantes (generados a partir de unas condiciones conocidas). La disponibilidad de un abanico de extractantes (en cuanto a composición) permite llevar a cabo la selección del más adecuado para cada aplicación.

En general la concentración de anfífilo en los SUPRASs es muy elevada. Para SUPRASs formados por micelas inversas<sup>8</sup>50 y vesículas de ácidos

---

<sup>7</sup> N. Heldt, J. Zhao, S. Friberg, Z. Zhang, G. Slack, Y. Li, *Tetrahedron*, 56 (2000) 6985.

<sup>8</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

carboxílicos<sup>9</sup> y micelas acuosas de SDS<sup>10</sup> y de Tritón X-114<sup>11</sup> encontramos valores de 0.25-0.75, 1, 0.2 y 0.09 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Normalmente la composición del disolvente no varía al modificar la concentración inicial de tensioactivo (manteniendo constantes las demás variables experimentales), aunque existen excepciones, así para SUPRAS constituidos por micelas no iónicas de Triton X-114, el contenido de agua de los mismos varía del 80 al 70% al cambiar del 1 al 3% de Triton X-114 a 35°C<sup>12</sup>. Se han observado comportamientos similares para SUPRASs de tensioactivos de silicona (PEG/PPG 18-18 dimethicone), para los cuales el contenido en agua varía del 70 al 50% a medida que la concentración de tensioactivo aumenta del 1 a 3%<sup>12</sup>.

La concentración de anfífilo en el disolvente depende principalmente de la estructura del tensioactivo y de las condiciones de coacervación. Como regla general, la concentración de anfífilo en el disolvente supramolecular decrece a medida que aumenta la longitud de la cadena y así ocurre para los ácidos carboxílicos en SUPRASs formados por vesículas de estos tensioactivos. Para tensioactivos alquiletoxilados, además de influir el número de átomos de carbono de la cadena, también influye el número de grupos de oxietileno causando una disminución de la concentración de anfífilos en el disolvente<sup>13</sup>.

Respecto a la influencia de las condiciones de coacervación, un ejemplo ilustrativo es el efecto de la temperatura en disolventes constituidos por agregados de tensioactivos no iónicos. En este caso, cuanto mayor sea la temperatura de trabajo respecto a la de *cloud point* se obtienen fases ricas en tensioactivo más compactas y de menor contenido en agua y volumen<sup>14</sup>. Por otro lado se ha observado la formación de fases más concentradas en anfífilo

---

<sup>9</sup> F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 78 (2006) 7229.

<sup>10</sup> I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 71 (1999) 4519.

<sup>11</sup> B. Yao, L. Yang, J. Colloid Interface Sci. 319 (2008) 316.

<sup>12</sup> B. Yao, L. Yang, J. Colloid Interface Sci. 319 (2008) 316.

<sup>13</sup> P. Taechangam, J.F. Scamehorn, S. Osuwan, T. Rirksomboon, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 347 (2009) 200.

<sup>14</sup> R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada, J. Chromatogr. A 902 (2000) 251.

con cantidades crecientes de HCl<sup>15</sup> y el co-tensioactivo 1-octanol<sup>16</sup> para tensioactivos aniónicos y catiónicos, respectivamente.

La adición de sales puede también afectar a la composición del coacervado. Por ejemplo, para un SUPRASs producido a partir de una disolución de Tergitol 15-S-7 (1%), el contenido en agua disminuye del 75 al 55% a medida que la concentración Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> crece del 0.4 al 0.6 M<sup>17</sup>.

En general, la diferencia en composición de los SUPRASs en función de las condiciones iniciales de generación, puede traducirse también en una diferencia en microestructura, la cual puede a su vez influir en la eficiencia o selectividad de la extracción. Así, se ha observado una transición de micelas esféricas a cilíndricas<sup>18</sup> o de fases vesiculares a lamelares<sup>1</sup> en función de las condiciones de coacervación.

#### 4. ADSORBENTES SUPRAMOLECULARES MAGNÉTICOS

---

Los adsorbentes supramoleculares son materiales muy versátiles para su uso en extracción en fase sólida (*solid-phase extraction, SPE*) gracias a la variedad de interacciones y la elevada eficiencia de extracción que suelen proporcionar. Tal y como se ha discutido en la introducción general (sección 2.2.) las hemimicelas son monocapas de tensioactivo adsorbidas sobre la superficie de un óxido mineral a través de interacciones electrostáticas (cargas opuestas) o quimiadsorción y las admicelas se forman como agregados esféricos sobre las hemimicelas a través de interacciones hidrófobas entre las cadenas.

La mayoría de las aplicaciones analíticas utilizan alúmina o sílice como óxido mineral y alquilsulfatos o sales de amonio cuaternario como tensioactivos. Los adsorbentes supramoleculares se han aplicado con éxito a

---

<sup>15</sup> D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 13.

<sup>16</sup> E.W. Crick, E.D. Conte, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 87.

<sup>17</sup> L. Li, B.H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* 263 (2003) 625.

<sup>18</sup> M. B. Sierra, P. V. Messina, M. A. Morini, J. M. Ruso, G. prieto, P. C. Schulz, F. Sarmiento, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 277 (2006) 75.

una variedad de analitos (clorofenoles, pesticidas, tensioactivos, ftalatos, compuestos perfluorados, etc.)<sup>19</sup> gracias a la variedad de interacciones que proporcionan: hidrófobas en la región hidrocarbonada de las cadenas e iónicas, puentes de hidrógeno o  $\pi$ -cation con los grupos polares.

A pesar del gran potencial de los adsorbentes supramoleculares como extractantes, existen una serie de desventajas que limitan su aplicabilidad. Las interacciones tensioactivo-óxido o tensioactivo-tensioactivo que dirigen el autoensamblaje de los agregados son electrostáticas o hidrófobas y por tanto no son estables al modificarse el pH o en presencia de disolvente orgánico. Esto conlleva que la extracción esté limitada en relación al intervalo de pH de trabajo y que los eluidos contengan una elevada concentración de tensioactivo. Esta alta concentración de anfifilo dificulta el acoplamiento de SPE admicelar con técnicas como cromatografía de gases o electroforesis capilar, haciendo necesaria una etapa previa de eliminación del tensioactivo<sup>20</sup>. También se puede producir supresión de ionización o interferencias en detectores de espectrometría de masas, fluorescencia o ultravioleta.

Por otro lado el formato habitual en cartucho, tanto para adsorbentes supramoleculares como convencionales, tiene limitaciones en cuanto a volúmenes de ruptura y posibles obstrucciones durante la filtración de la muestra, lo cual se traduce en tiempos de extracción largos e irreproducibles. En este sentido la extracción en fase sólida dispersa (*dispersive solid-phase extraction, dSPE*), en la que el adsorbente se dispersa en la muestra líquida y se retira mediante centrifugación tras la extracción de los analitos, permite acelerar el proceso de extracción y superar estas desventajas.

En la última década el uso de nanopartículas magnéticas en procesos de extracción está ganando popularidad, ya que ofrecen elevada área superficial, son fáciles de funcionalizar y permiten llevar a cabo extracciones en fase sólida dispersa de forma simple y rápida, ya que se puede retirar el adsorbente con facilidad bajo la acción de un simple imán.

---

<sup>19</sup> S. Gangula, S. Suen, E. D. Conte, *Microchem. J.* 95 (2010) 2.

<sup>20</sup> M. Hirade, J. Iwasawa, H. Tawaguchi, *Talanta*, 44 (1997) 231.

Los adsorbentes magnéticos (generalmente nanopartículas de magnetita) se recubren con una capa de carbón, sílice, alúmina o polímeros para darle estabilidad y evitar la alteración de las propiedades magnéticas o su oxidación a pH ácidos<sup>21,22</sup>. Además las nanopartículas magnéticas pueden funcionalizarse con organosilanos o ligandos específicos para hacer la extracción de compuestos orgánicos<sup>23</sup> o metales más selectiva<sup>24,25</sup>. Recientemente la biofuncionalización de nanopartículas magnéticas con anticuerpos se ha propuesto para la detección de *E.coli*<sup>26</sup>.

Por otro lado se ha extendido el uso de nanopartículas magnéticas recubiertas de tensioactivos que forman hemimicelas y/o admicelas para la extracción de contaminantes<sup>27,28</sup>.

Las nanopartículas magnéticas se han aplicado con éxito a la extracción de metales<sup>24,25</sup>, PAHs<sup>29,30</sup>, compuestos fenólicos<sup>27,31</sup>, pesticidas<sup>32</sup> y compuestos perfluorados<sup>33</sup>. La extracción se lleva a cabo a través de interacciones principalmente hidrófobas o electrostáticas y a través de la formación de enlaces covalentes en algunos casos (ver figura 4.a). Después de la extracción, la desorción de los analitos se hace a través un cambio de pH, ligandos de intercambio o adición de disolvente orgánico.

---

<sup>21</sup> M. Safarikova, I. Safarik, J. Magn. Magn. Mater., 194 (1999) 108.

<sup>22</sup> M. Safarikova, P. Lunackova, K. Komarek, T. Hubka, I. Safarik, J. Magn. Magn. Mater., 311 (2007) 405.

<sup>23</sup> Y. Sha, C. Deng, B. Liu, J. Chromatogr., A 1198 (2008) 27.

<sup>24</sup> C. Huang, B. Hun, Spectrochim. Acta, Part B, 63 (2008) 437.

<sup>25</sup> J. Sabo, S. B. Hu, H. Peng, C.Huang, Talanta, 77( 2009) 1579.

<sup>26</sup> Y. Cheng, Y. Liu, J. Huang, K. Li, W. Zhang, Y. Xian, L. Jin, 77 (2009) 1332.

<sup>27</sup> X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, Environ. Sci. Technol., 42 (2008) 1201

<sup>28</sup> L. Sun, C. Zhang, L. Chen, J. Liu, H. Jin, H. Xu, L. Ding, Anal Chim. Acta, 638 (2008) 162.

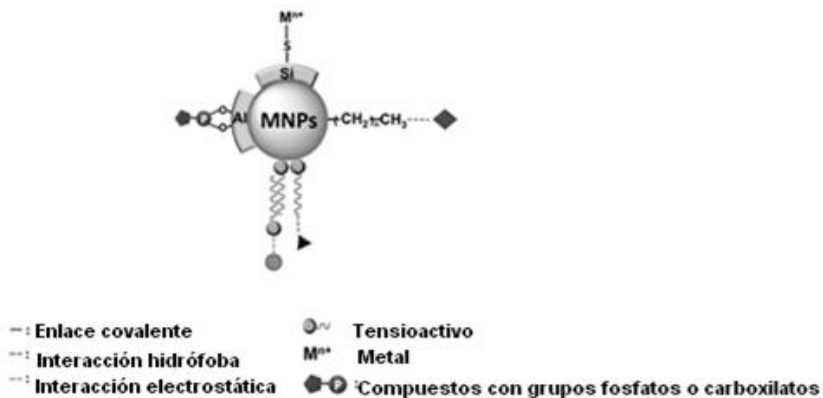
<sup>29</sup> Z.G. Shi, H.K. Lee, Anal. Chem., 81 (2010) 9012.

<sup>30</sup> S. Zhang, H. Niu, Y. Cai, Y. Shi, Anal. Chim. Acta, 665 (2010) 167.

<sup>31</sup> J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, J. Chromatogra. A, 1180 (2008) 24.

<sup>32</sup> C.C. Hsu, C.W. Whang, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 8575.

<sup>33</sup> X. Zhang, H. Niu, Y. Pan, Y. Shi, Y. Cai, Anal. Chem., 82 (2010) 2363.



**Figura 4.a Tipos de interacciones proporcionadas por las nanopartículas magnéticas para la extracción de contaminantes orgánicos y metales.**

El recubrimiento de la magnetita con capas simples o dobles de ácidos alquilcarboxílicos se ha usado de forma convencional para preparar ferrofluidos, que son suspensiones coloidales estables de nanopartículas magnéticas en un líquido portador. Los ferrofluidos se han usado ampliamente en la fabricación de altavoces, componentes de *hardware* y dispositivos de ingeniería aeronáutica, ya que tienen propiedades como disipadores de calor, reductores de la fricción y capacidad de sellado y amortiguación.

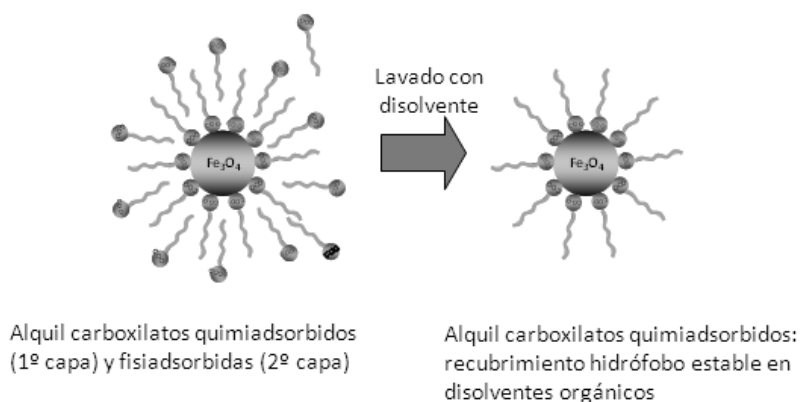
El recubrimiento de la magnetita con una capa de alquilcarboxilatos ocurre a través de la quimiadsorción mediante la formación de quelatos bidentados mononucleares con los átomos de hierro<sup>34,35</sup>. Este enlace covalente proporciona una cubierta hidrófoba estable y permite la dispersión de las nanopartículas en disolventes no polares.

<sup>34</sup> P. Roonasi, A. Holmgren, Appl. Surf. Sci., 255 (2009) 5891.

<sup>35</sup> C. Rocchiccioli-Deltcheff, R. Frank, V. Cabuil, R.J. Massart, Chem. Res. Synop., 5 (1987) 126.



Los alquilcarboxilatos reaccionan rápidamente con la magnetita a elevadas temperaturas (70-90°C) para producir una monocapa de hemimicelas de tensioactivo quimiadsorbido sobre el óxido y capas adicionales o admicelas formadas por interacciones hidrófobas entre las cadenas<sup>36,37</sup> (ver figura 4.b). La mayoría de las aplicaciones se basan en la preparación de nanopartículas magnéticas de 10-15 nm que son recubiertas durante la síntesis, actuando el tensioactivo como un limitador del crecimiento, o tras la síntesis en una etapa posterior. Para la dispersión de las



**Figura 4.b. Nanopartículas magnéticas recubiertas de alquilcarboxilatos**

nanopartículas en disolventes no polares se elimina el tensioactivo fisiadsorbido mediante lavado con disolventes polares como etanol.

La quimiadsorción de tensioactivos sobre magnetita también se ha descrito para compuestos anfífilos con grupos fosfato<sup>38</sup>.

Aunque se han propuesto metodologías basadas en adsorbentes de nanopartículas recubiertas de tensioactivos para extracciones analíticas, el uso de procesos de quimiadsorción para evitar la ruptura de los agregados y obtener eluidos libres de tensioactivos es una estrategia no explorada. En este

<sup>36</sup> M.V. Avdeev, D. Bica, L. Vekas, O. Marinica, M. Balasoiu, V.L. Aksenov, L. Rosta, V.M. Garamus, A.J. Schreyer, J. Magn. Magn. Mater., 311 (2007) 6.

<sup>37</sup> X. Wang, C. Zhang, X. Wang, H. Gu, Appl. Surf. Sci., 253 (2007) 7516.

<sup>38</sup> Y. Sahoo, H. Pizem and T. Fried et al., Langmuir, 17 (2001), 7907.

segundo Bloque de la Tesis Doctoral se aborda el estudio de hemimicelas de alquilcarboxilatos adsorbidas sobre nanopartículas de magnetita para la extracción de compuestos hidrófobos como PAHs. La interacción covalente permite la no ruptura de las hemimicelas durante la elución y la obtención de eluidos libres de tensioactivo.



# Capítulo 5

---

*Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants*

---



---

**Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants\***

---

**ABSTRACT**

Self-assembly, the process through which supramolecular solvents (SUPRASs) with ordered structures are produced, gives unique opportunities to get tailored solvents with advanced functional features. In this work, environment-responsive ( $C_7$ - $C_{14}$ ) alkanol-based SUPRASs were synthesized and their potential in analytical extractions investigated. It was proved that the global composition of these solvents, the size of the coacervate droplets making them up and the aqueous cavities of the inverted hexagonal arrangement of alkanols could be tailored by proper control of the environment (viz. the THF:water proportion) in which the self-assembly of alkanols took place. Interestingly, all these tailored features reversibly switched by modifying the environment, so these solvents behaved as adaptive. Equations were derived proving that the spontaneous self-assembly process followed predictable routes and both composition and volume of the solvent produced could be predicted. Both light and cryo-scanning electron microscopy were used for structural elucidation. Applications in extraction processes were developed that exploited the molecular size-based restricted access properties of SUPRASs and their ability to establish mixed-mode mechanisms for solute solubilisation. In the first case, solutes with increasing molecular weight (Ochratoxin A, Acid Red97 and Brilliant Blue G) were

**\*A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio  
Submitted to Anal. Chem.**

extracted from cereal baby food and sludge, the recoveries obtained being dependent on the vacuole size in the SUPRAS. It was checked that macromolecules such as proteins, carbohydrates and humic acids were not extracted in the solvent, this behaving as a restricted access material. The ability of these SUPRASs to establish both hydrogen bonding and dispersion interactions was exploited for the extraction of carcinogenic chlorophenols (CCPs) in environmental waters. A thorough study was carried out for determining the variables influencing the extraction efficiency of these solutes by SUPRASs with the aim of setting up predictable and widely applicable extraction schemes. Concentration factors in the range 215-237 with recoveries above ~90% in river, beach and reservoir water samples were obtained for all the CCPs using a simple and rapid extraction (5 min) without the need for clean-up. The quantification limits were in the range 0.21-0.23  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; low enough to comply with legislative limits (0.4-1  $\mu\text{g L}^{-1}$  for pentachlorophenol).

## **1. INTRODUCTION**

---

Tailored solvents represent a whole new paradigm in manufacturing and processing.<sup>1</sup> Designing and producing solvents that meet programmed, specific requirements for a particular purpose, highly increases the opportunity to get improvement in process economics, selectivity and yield. Revolutionary applications have been developed in the last decade in areas such as chemistry,<sup>2</sup> chemical engineering,<sup>3</sup> biotechnology,<sup>4</sup> coating,<sup>5</sup> energy,<sup>6</sup> extraction<sup>7</sup> and others, using ionic liquids tailored by a judicious variation in the length and branching of the alkyl chain and the anionic precursor. Some chemical tunability can be also obtained with supercritical solvents, especially carbon dioxide, in the presence of additives,<sup>8</sup> and with fluoruous phases.<sup>9</sup>

Self-assembly, the process by which isolated components organize autonomously and spontaneously into ordered and/or functional structures, has become one of the most general and powerful strategy now available for the production of designed structures from components with sizes ranging

from the molecular to the macro scale.<sup>10</sup> Self-assembly processes are giving access to advanced functional supramolecular materials (e.g. supramolecular polymers,<sup>11</sup> liquid crystals,<sup>12</sup> solid-state assemblies,<sup>13</sup> etc) and providing an original approach to nanoscience and nanotechnology<sup>14</sup> (e.g. the bottom-up approach). However, all this appealing power remains practically unexplored for the production of tailored solvents despite self-assembly has already been proved as an invaluable strategy for the synthesis of ordered structure-based solvents from amphiphiles through energyless synthetic routes.

Ordered structure-based solvents have been long known by colloidal and analytical chemists involved in the study and application of the phenomenon of liquid-liquid phase separation occurring in micellar solutions of non-ionic surfactants under heating (*viz. cloud point*).<sup>15-18</sup> Separation of surfactant-rich liquid phases from micellar and vesicular solutions of zwitterionic<sup>19</sup> or ionic surfactants under addition of salts,<sup>20,21</sup> pH change<sup>22</sup> or in the presence of a non-solvent for the amphiphile,<sup>23</sup> has been also reported (*viz. coacervates*). Other terms to refer to coacervates have been *L<sub>3</sub>*, *anomalous* and *sponge* phases, although it is not clear whether the terms all refer to the same systems.<sup>24</sup> Recently, the term *supramolecular solvent* (SUPRAS) has been suggested to emphasize that amphiphiles form self-organized supramolecular structures in the solvent, this being the most distinctive feature compared to molecular solvents and ionic liquids.<sup>25</sup> A unique property of SUPRASs is the presence of different polarity regions in the aggregates making them up and, consequently, their capacity to solubilise, concentrate, compartmentalize, organize and localize wide range polarity solutes thus providing specific reaction environments and separation media. Valuable applications of SUPRASs in analytical extractions have been reported so far for both metals<sup>26,27</sup> and organic compounds<sup>28</sup> in environmental, biological and food samples.

In this work, the possibility of developing tailored supramolecular solvents through self-assembly processes, with the aim of exploring new and outstanding analytical applications, was firstly investigated. There are four key factors (*viz.* component structure, environment, and binding and driving



forces) that can be used to control a self-assembly process<sup>29</sup> and that results in multiple opportunities to get tailored SUPRASs. Amphiphiles are ubiquitous in both nature and synthetic chemistry and display a wide variety of alkyl chains and polar head groups, so, tailoring the amphiphile structure provides the first means of obtaining tunable solvent properties. Likewise, the components have to be embedded in a proper environment (e.g. a solution) for the binding force to act. If the environment is tailored or dynamically changed, aggregates will be reformed and indistinguishable from the original, so they behave as adaptive materials. Thus, the potential exists to have solvents with properties that can be switched reversibly upon command. The binding forces (e.g. coulomb, van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  and  $\pi$ -cation interactions, hydrogen bonding, electromagnetic or capillary forces, etc) have to be reversible in order to generate ordered structures in self-assembly, so they must be comparable to the forces tending to disrupt the aggregates. Lastly, components must be mobile for self-assembly to occur. In solution, thermal noise is the driving force for molecular self-assembly, while in nano, mesoscopic and macroscopic self-assembly systems, Brownian motion rapidly becomes irrelevant, and gravity and friction become important.

Herein, we report the synthesis, characterization and application in analytical extraction processes of environment-responsive SUPRASs consisting of micellar aggregates of C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub> alkanols in THF:water mixtures. Composition and structure of the SUPRASs synthesized as a function of the environment where the self-assembly of alkanols took place were systematically investigated. The knowledge gained in this study provided the basis for the analytical applications developed, which involved the extraction of organic compounds based on the restricted access properties of these solvents and their capability to establish mixed-mode mechanisms for interactions with solutes. Below, the main results obtained in this study are outlined.

---

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

---

### 2.1. Chemicals

All chemicals were analytical reagent-grade and used as supplied. The following reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): the aliphatic alcohols, 1-heptanol (C7), 1-octanol (C8), 1-decanol (C10), 1-dodecanol (C12) and 1-tetradecanol (C14); the carcinogenic chlorophenols (CCPs), 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), 2,3,4,6-tetrachlorophenol (2,3,4,6-TCPP) and pentachlorophenol (PCP); and the reagents decanoic acid, ochratoxin A (OTA), brilliant blue G (BBG), gluten, starch, humic acid sodium salt, acid red 97 and chitosan. The carcinogenic 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Triton-X114, albumin from bovine serum and chicken egg white and lysozyme from chicken egg white were obtained from Fluka (Madrid, Spain). Tetrahydrofuran (THF), methanol (MeOH) and LC-grade acetonitrile (ACN) were supplied by Panreac (Sevilla, Spain) and ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Stock standard solutions containing individual CCPs at a concentration of  $1 \text{ g L}^{-1}$  were prepared in methanol and stored at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in the dark. Working solutions containing a mixture of CCPs were made by appropriate dilution of the stock solutions with methanol.

### 2.2. Phase diagrams and SUPRAS volumes

Phase diagrams for the ternary mixture THF:water:*n*-alkanol were constructed in order to delineate the region for SUPRAS formation. Simultaneously, the volume of SUPRAS produced in this region was measured. For this purpose, the three components were mixed at different mass fractions (total weight 10 g) in 10mL glass centrifuge tubes, magnetically stirred (700 rpm, 1min) and centrifuged to accelerate phase separation (2500 rpm, 5 min). The phase boundaries were assigned by visual inspection. The criterion to determine the formation of SUPRAS was the

appearance of two immiscible isotropic liquid phases in the system. The volume of SUPRAS (upper phase) was calculated by measuring its height in the cylindrical tube with a digital calliper. For measuring low SUPRAS volumes (less than  $\sim 1$  mL), specially designed 10 mL centrifuge tubes with narrow necks ( $\sim 7$  mm i.d.) were used instead. Experiments were performed in duplicate.

### **2.3. SUPRAS composition**

The mass fraction of THF, water and *n*-alkanol in the SUPRAS as a function of the composition of the environment where the self-assembly of *n*-alkanols took place was determined. Water content was measured with a coulometric Karl-Fisher titrator (KF 831 model, Methrom, Herisau, Switzerland). The content of *n*-alkanol was calculated by removing water and THF from a certain amount of SUPRASs ( $\sim 1$  g) and weighting the remaining pure solid or liquid alkanol. For this purpose, SUPRAS aliquots stood at room temperature in open tubes for 3 days. Under these conditions, THF and most water evaporated. Then, they were subjected to freeze-drying for 24 h to remove remaining traces of water. Finally, the content of THF was calculated as the difference between the total weight and the measured components. Experiments were made in triplicate.

### **2.4. SUPRAS characterization**

Light microscopy studies were performed with a Leica instrument, model DME, equipped with an automatic photcamera, using the bright field. As THF easily evaporates under light microscopy observation, only micrographs taken right from the beginning of each preparation were considered. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) studies were carried out using a CT-1000 cryo-transfer system (Oxford Instruments, Oxford, UK) interfaced with a JEOL JSM-5410 scanning electron microscope. SUPRASs were prepared by dissolving *n*-alkanols (200-500 mg) in a mixture of THF:water

(10 mL) in 15mL centrifuge tubes. The mixture was magnetically stirred for 5 min, at 700 rpm, and then centrifuged to accelerate phase separation (2500 rpm, 5 min). A drop of SUPRAS was placed over a piece of 0.2  $\mu\text{m}$  filter paper and then frozen in slush  $\text{N}_2$  and attached to the specimen holder of the cryo-transfer system. It was transferred to the microscope sample stage where it was sublimed by controlled temperature at  $-90\text{ }^\circ\text{C}$  during 1-3 min until the coacervate droplets appeared. Afterwards, the sample was transferred again to the cryostage in order to gold coat it by sputtering and then put back to the microscope sample stage to be observed.

## **2.5. Recovery studies**

### **2.5.1. Microextraction of OTA in cereal baby food**

A multicereal-based baby food was bought in a local supermarket. Aliquots of the blank sample (400 mg) were fortified to a final concentration of  $10\text{ }\mu\text{g Kg}^{-1}$  of OTA and allowed to stand for 12 h before analysis. Microextraction of OTA was carried out with SUPRASs synthesized from 200 or 300 mg of decanol dissolved in THF:water (10 mL) at different ratios (see Table 1). Sample and SUPRASs were mixed in 2mL microcentrifuge tubes, vortex agitated (15 min) and centrifuged (15000 rpm, 10 min). Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  of the SUPRAS were directly analyzed by LC-FL using Breeze HPLC system of Waters (Milford MA) that consisted of a 1525 binary pump, a 717 plus automatic injector, a 1500 series column heater, a 2475 multiwavelength fluorescence detector and a 2898 photodiode array detector. The stationary-phase column was a Kromasil  $\text{C}_8$  (length 25 cm, particle size  $5\mu\text{m}$ , internal diameter 4 mm) from Análisis Vínicos (Tomelloso, Spain). The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 1% acetic acid. The elution program was: isocratic conditions (55% A) for 5 min, linear gradient from 55% to 50% in A for 15 min and then isocratic conditions (50% A) for the next 15 min. The flow-rate was  $1\text{ mL min}^{-1}$ . OTA was monitored at  $\lambda_{\text{ex}} 334\text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} 460\text{ nm}$ . The retention time was 24.0 min.

### **2.5.2. Microextraction of dyes in sludge**

Activated and dehydrated sludge was collected from a wastewater treatment plant (WWTP) located in Pozoblanco in the South of Spain in December 2010. This WWTP receives mainly domestic effluents. The dehydrated sludge was freeze-dried in a Telstar Cryodos-50 freeze dryer (Terrassa, Spain), finely ground (<0.5 mm), and stored in glass amber bottles at 4 °C until analysis. Activated sludge was filtered and then processed as dehydrated sludge. Aliquots of the blank sludge sample (300mg) were fortified to a final concentration of 1.7 mg Kg<sup>-1</sup> of Acid Red 97 and Brilliant Blue G and allowed to stand for 12 h before analysis. SUPRASs were prepared in the same way as for OTA determination and also extractions were carried out following identical procedure. Aliquots of 5 µL of SUPRAS were analyzed by LC-DAD. The mobile phase consisted of a isocratic mixture of methanol:water(50 mM ammonium acetate) at a flow rate of 1 mL/min. Acid Red 97 and Brilliant Blue G were determined at 496 and 610 nm, respectively. Retention times were 10.9 and 15.8 min.

## **2.6. Determination of carcinogenic chlorophenols in surface and ground waters**

### **2.6.1. Sample collection and preservation**

Water samples were collected in dark glass containers from two rivers (Guadalquivir and Guadajoz), a reservoir (Navallana) and the Mediterranean (Los Álamos and La Malagueta beaches) and the Atlantic Seas (Puerto de Santa María beach) in April 2011. All sampling sites were located in Córdoba, Málaga or Cádiz (Southern of Spain). Samples were filtered through 0.45 µm pore size filters from Watman GF/F Osmonics (France) in order to remove suspended solids, acidified to pH ~2.5 with 12 M hydrochloric acid and stored at 4 °C until analysis.

### **2.6.2. SUPRAS-based microextraction**

1-Decanol (100 mg) was dissolved in 3 mL of THF into 40 mL centrifuge tubes with a narrow neck (7.5 mm i.d.). Afterwards, a sample aliquot of 37 mL (pH ~2.5) was added and the SUPRAS formed instantaneous and spontaneously. The mixture was stirred (1000 rpm, 5 min) to break the solvent up into droplets, which accelerated analyte extraction, and then centrifuged (3500 rpm, 10 min) to speed up the complete separation of the solvent from the aqueous solution. The volume of the solvent (~150  $\mu$ L), which was standing at the top of the solution in the narrow neck of the tube, was calculated by measuring its height with a digital calliper. Aliquots of 100  $\mu$ L were withdrawn using a microsyringe and transferred to a sealed glass vial with insert (~150  $\mu$ L capacity) for posterior analysis.

### **2.6.3. Liquid chromatography-photometry**

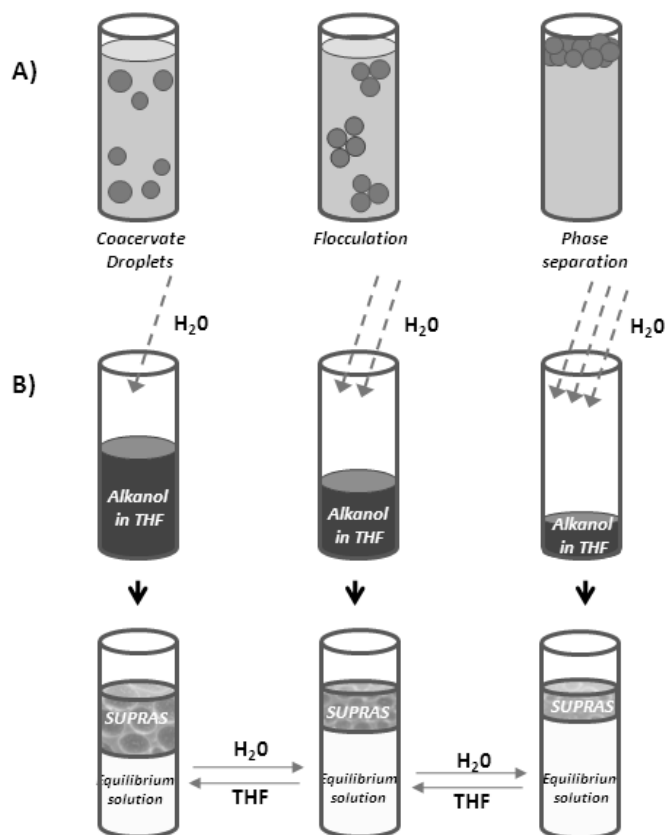
The liquid chromatographic system used for analysis of CCPs consisted of a 1525 binary pump, a 717plus automatic injector, a 1500 series column heater and a 2898 photodiode array detector (Breeze HPLC, Waters, Milford MA). The stationary-phase column employed was a Ultrabase C18 (particle size 5  $\mu$ m, internal diameter 4.6 mm, length 25 cm), supplied by Análisis Vínicos (Sevilla, Spain), which was kept at 32 °C. The mobile phase was made up of water (solvent A) and methanol/acetonitrile (85:15, solvent B), both containing 1% acetic acid. The gradient elution program was as follows: isocratic conditions with 63% B for 1 min, linear gradient from 63% to 76% B for 7.5 min and from 76% to 97% B for 4.5 min, then 97% B for 5 min and linear gradient from 97% to 100% B for 2 min. The reconditioning of the column took about 10 min. The flow rate was set at 1 mL min<sup>-1</sup>. Wavelengths (nm) used for measurement were 286 for 2,4-DCP, 290 for 2,4,5-TCP and 2,4,6-TCP, 300 for 2,3,4,6-TTCP and 304 nm for PCP. Individual CCPs were quantified by measuring peak areas provided by 12.5  $\mu$ L aliquots of SUPRAS containing analyte concentrations over the range 0.05-10 mg L<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

---

Alkanol-based SUPRASs were synthesized by adding water to solutions of (C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>)-alkyl alcohols in tetrahydrofuran. Water promoted the self-assembly of alkanols and caused the spontaneous formation of oily droplets (i.e. coacervate droplets) that flocculated through the formation of conglomerates of individual droplets. The overall density of such conglomerates was slightly lower than that of the solution in which they were formed, leading to creaming and phase separation (coacervate phase or SUPRAS) from the bulk solution (Figure 1A). The process occurred over the entire aqueous pH range. The alkanol-rich SUPRAS was in equilibrium with the alkanol-poor bulk solution. Both the volume of SUPRAS produced and the size of the spherical droplets making it up (observed by optical microscopy) decreased with increasing proportions of water in the bulk solution (Figure 1B). This behaviour suggested that both SUPRAS composition and structure were environment-responsive. The phenomenon was reversible and both SUPRAS composition and aggregate size could be switched upon command by adding water or THF to the equilibrium solution.

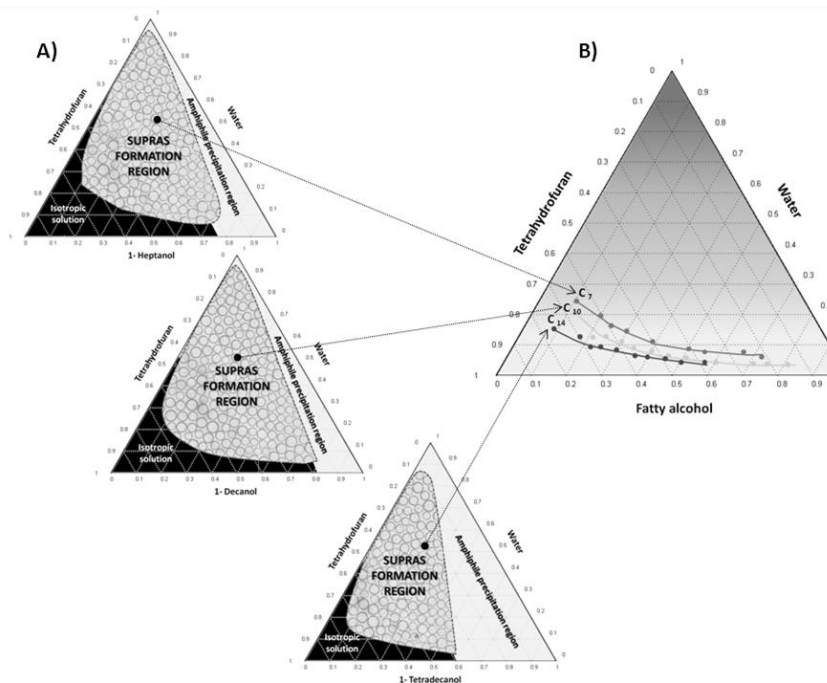
Representative phase diagrams depicting the boundaries for the region where separation of two isotropic liquids occurred from ternary mixtures of alkanol, THF and water, expressed as mass fractions, are shown in Figure 2A. Beyond these boundaries, alkanols insolubilized or gave a single isotropic solution, the latter due to the similarity of the densities of the SUPRAS and the equilibrium solution as the content of THF in the mixture increased. In the case of alkanols that are liquids at room temperature (i.e. C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), the boundary for amphiphile precipitation and SUPRAS formation regions was established from the difference in volumes between the insolubilized pure alkanol and the SUPRAS, the latter being higher owing to the incorporation of water and THF (an increase of more than 10% in volume was considered as a criterion). Formation of SUPRASs above this boundary was later checked by microscopy.



**Figura 1. Schematics of (A) SUPRAS formation in the bulk solution and (B) the influence of the environment (water/THF proportion) on the coacervate droplet sizes and volume of SUPRAS obtained**

Since the environment dependence of the composition and structure of SUPRASs can greatly influence their analytical applications, some experiments were undertaken to gain knowledge about these new solvents and establish the analytical consequences of this dependence in order to be able to anticipate and set up efficient extraction schemes.





**Figure 2.6.** Phase diagrams showing (A) the behavior of ternary mixtures made up of alkanol ( $C_7$ ,  $C_{10}$ , or  $C_{14}$ ), THF and water and (B) the composition of the solvents produced in the SUPRAS formation region. Concentrations expressed as molar fractions

### 3.1. SUPRAS composition tuning

The composition of the solvents produced in the *SUPRAS formation region* (Fig. 2A) from the different alkanols was investigated as a function of the initial composition of the ternary mixture (alkanol, THF and water) that underwent self-assembly. Figure 2B shows the results obtained for three representative alkanols. SUPRASs made up of surfactant, THF and water, at amphiphile concentrations between 10 and around 80% (w/w) and THF:water percentage ratios (w/w) ranging in a short interval for each alkanol, but hydrocarbon chain length dependent (e.g. 2.7-4.5, 3.5-7.8 and 4.8-9.1 for  $C_7$ -,  $C_{10}$ - and  $C_{14}$ -alkyl alcohol, respectively), were obtained.

Solvent composition was not affected by the content of alkanol in the bulk solution over a range up to  $\sim 5\%$  w/w (region of analytical interest), the

volume of solvent produced being linearly dependent on it. However, the variation of the environment in the bulk solution resulted in the synthesis of SUPRASs in a broad range of compositions. Thus, the increasing of the THF/water percentage (w/w) ratio from 0.05 to 1.3 resulted in the progressive incorporation of both THF and water to the SUPRAS, which became more and more diluted with respect to the alkanol. The volume of solvent obtained increased exponentially with the content of THF in the bulk solution.

Nonlinear regression was used to fit a model to the data obtained ( $n=80$ ) in order to be able to predict the SUPRAS volume that should be obtained from a specific alkanol-THF-water ternary mixture in the bulk solution. This procedure uses an iterative approach to minimize the sum-of-squares of the vertical distances for the experimental points to a proposed curve based on preliminary estimates.<sup>30</sup> Equations for prediction of SUPRAS composition (THF, water and  $n$ -alkanol content) were defined by fitting experimental data of THF and water content in SUPRASs as a function of the initial concentration of these components before phase separation to a second degree polynomial regression and a multiple linear regression models, respectively, both based on a least squares approach.

The percentage (w/w) of water in the SUPRAS obtained from a specific alkanol ( $Y_{ws}$ ) was negatively correlated with both the percentage (w/w) of water in the bulk solution ( $X_{wb}$ ) and the number of carbon atoms of the alkyl alcohol ( $Z$ ), according to the equation

$$Y_{ws} = A - BX_{wb} - CZ \quad [1]$$

where  $A$ ,  $B$  and  $C$  and their respective standard errors were  $42.2 \pm 1.5$ ,  $0.31 \pm 0.01$  and  $0.998 \pm 0.091$ . The correlation coefficient was 0.9729. This relationship indicated that SUPRASs containing high percentages of water will only be obtained from alkanol-THF-water ternary mixtures containing high percentages of THF. On the other hand, the water content in SUPRASs synthesized from a specific alkanol-water-THF mixture will follow the order  $C_7 > C_8 > C_{10} > C_{12} > C_{14}$ .

The dependence of the THF content in the SUPRAS ( $Y_{ts}$  %, w/w) on its content in the bulk solution ( $X_{tb}$  %, w/w) was described by the function

$$Y_{ts} = A + BX_{tb} - CX_{tb}^2 \quad [2]$$

where A, B, and C and their respective standard errors were  $6.3 \pm 0.2$ ,  $2.4 \pm 0.1$  and  $0.024 \pm 0.002$ . The correlation coefficient was 0.9851. The alkyl chain length of the alkanol did not influence  $Y_{ts}$ .

Equations 1 and 2 establish that the spontaneous process of self-assembly through which the alkanol-based SUPRASs are synthesized follows predictable routes that can be used to get solvents with the desired properties. The amount of product obtained in the process (i.e. solvent volume) can be also predicted through the equation

$$Y = X [A + e^{BZ}] \quad [3]$$

where the dependent variable, Y, is the volume of SUPRAS in  $\mu\text{L}$ , while the independent variables X and Z are the amount of alkanol in mg and the percentage of THF (v/v) in the THF:water mixture in the bulk solution, respectively. Values of 0.17 and 0.0389 were estimated for A and B with standard errors of 0.02 and 0.0003, respectively. The correlation coefficient for the equation was 0.986. The linear dependence of the SUPRAS volume with the amount of alkanol also corroborated that SUPRAS composition was alkanol-independent.

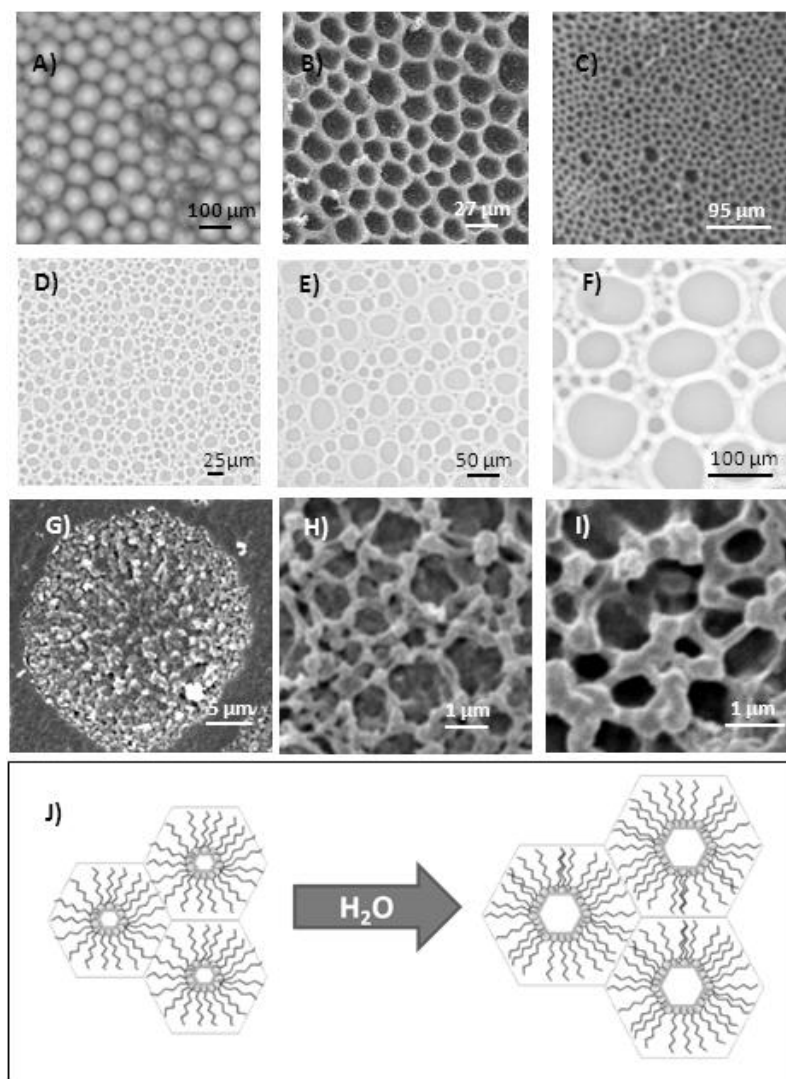
Equations 1-3 were only fulfilled at concentrations of alkanols in the bulk solution lower than around 5% (w/w), which are the typical concentrations used in analytical applications. Higher concentrations of these amphiphiles gave SUPRASs in the range of compositions shown in Figure 2B but THF or water were limiting reactants and neither the composition nor the volume of SUPRAS could be predicted. Other variables such as concentration of sodium chloride and pH only influenced the volume of SUPRAS produced at values beyond the typical range of analytical interest. Thus, the SUPRAS volume kept constant in the pH interval 2-10 and decreased in about 15% at

pH 1.5. Regarding salt concentration, SUPRAS volumes kept constant up to about 0.1 M and increased around 12% at 1 M.

Equation 3 makes it possible to know a priori the maximum concentration factors that can be achieved in extractions with alkanol-based SUPRASs thus making easier method selection and optimisation. Interestingly, SUPRAS at the required compositions (Figure 2B) could be prepared by direct mixing of the components. This direct synthetic route is valuable to save reactants (i.e. THF) in applications not involving the equilibrium of SUPRAS with the aqueous solution (e.g. as reaction media, extractants of components from solid matrixes, etc).

### ***3.2. Coacervate droplet size tuning and microstructure***

Detailed analysis of the alkanol-based SUPRASs by light and cryo scanning electron microscopy (cryo-SEM) revealed that they consisted of a cluster of hexagonal droplets (Figure 3, panels A-C), the pictures nearly resembling those from inverted hexagonal phases in liquid crystals<sup>31,32</sup> (i.e. hexosomes or H<sub>2</sub> phases). The size of the droplets depended on the environment where the self-assembly and liquid phase separation of alkanols occurred. As an example, Figure 3 (panels D-F) shows representative light micrographs for SUPRASs made up of decanol synthesized in environments consisting of variable THF percentages. To the best of our knowledge, SUPRASs with coacervate droplets exhibiting hexagonal structures have not been observed previous to this report.



**Figure 3.2.** Micrographs of coacervate droplets showing (A-C) the hexagonal arrangement of alkanols and (D-F) the droplet size dependence of alkanol self-assembly on the environment. Micrographs showing (G) the porous microstructure of the coacervate droplets and (H,I) the hexagonal pore structure. (J) Schematic of the effect of water addition on the size of the polar core of the inverted hexagonal structures. Micrographs obtained by (A,D-F) light microscopy in the bright field and (B,C,G-I) cryo-SEM. Experimental conditions: Decanol-based SUPRAS produced in environments containing THF at the following percentages (v/v): (A) 50%, (B,C,E) 30%, (D) 20%, (F) 60%; SUPRAS containing also Rhodamine B at 10 μM (D,E,F). (G-I) Tetradecanol-based SUPRAS produced at 30% THF

Two facts became evident from microscopic analysis; first, the size of the coacervate droplets progressively increased as the percentage of THF in the bulk solution did, and secondly, droplets were distributed in a quite narrow size range (e.g.  $\sim 1\text{-}5\mu\text{m}$ ,  $\sim 5\text{-}20\ \mu\text{m}$ ,  $\sim 20\text{-}40\mu\text{m}$ ,  $\sim 40\text{-}60\mu\text{m}$ ,  $\sim 60\text{-}100\mu\text{m}$  and  $\sim 100\text{-}200\mu\text{m}$ , for decanol self-assembled in environments containing 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 60%, THF). Dynamic light scattering (DLS) was unsuccessful to determine coacervate droplet size distribution more exactly since the concentration of alkanols in the SUPRAS ranged from 0.07 to 0.68  $\text{mg}\ \mu\text{L}^{-1}$  and this technique requires diluted solutions to make interparticle interaction negligible and thus avoiding multiple scattering phenomena. Dilution of SUPRASs to lower alkanol concentration was completely unacceptable owing to the environment-responsive character of the aggregates making them up.

Higher magnification of cryo-SEM micrographs revealed the porous morphology of the droplet surface (Figure 3, panel G), its structure showing a clear hexagonal arrangement of alkanols (Figure 3, panels H,I). The hexagonal holes (apparent diameters ranging approximately from some tenth of  $\mu\text{m}$  to about  $0.5\ \mu\text{m}$ ) were considered to be openings of the water channels from the interior of the matrix, while THF is suggested to be the continuous phase where the coacervate droplets making up the SUPRAS were dispersed. Vacuoles with apparent diameters ranging from  $0.2$  to  $3\ \mu\text{m}$  have been described for gum Arabic-chitosan coacervates that display a sponge-like microstructure.<sup>33</sup>

Water/alkanol molar ratios in the global composition of SUPRASs ranged approximately from 0.5 to 15, which is the common interval found in reverse micelles.<sup>34,35</sup> The molar ratios were environment-dependent; they increased as water content in the bulk solution decreased (see equation 1) and, consequently, higher size aqueous cores were obtained. Figure 3 (panel J) illustrates the effect of adding water to the hexagonal phase lattice which inevitably causes the interfacial area per alkanol to increase.<sup>36</sup> Because of the lability of the aggregates and the consequent difficulty to operate with them in cryo-SEM, the accurate sizes of the holes in the SUPRASs at the different

environmental conditions could not be established. The water/alkanol molar ratio was also alkanol-dependent; it decreased as the chain length increased (see equation 1) that reducing the size of the aqueous holes as a result. A probable reason is that the electron-donating inductive effect of the alkyl groups tends to diminish the proton-donor ability of the higher alkanols, thereby reducing the molecular interactions in number and strength. The THF/alkanol molar ratio in the SUPRAS increased as a function of both the size of coacervate droplets and the length of the hydrocarbon chain which is in agreement with the hypothesis that THF is the continuous medium in which the hexagonal aggregates disperse.

Water was the directing agent of the hexagonal arrangement of alkanols; non ordered structures have been detected for these surfactants in THF as investigated using refractive indexes<sup>37</sup> or densities and ultrasonic speeds.<sup>38</sup> Main conclusion in these studies is that THF solvation competes with alkanol self-association (mainly as dimers and tetramers). The solvation is increasingly favoured with regard to the self-association when the C-atom number of the alkanol increases, since alcohol oligomers are easier to break. Aggregation of alkanols in THF was also investigated in this work using the fluorescent probes rhodamine B, pyrene, and 1-pyrene butyric acid and varying the alkanol concentrations between 0 and 80 mM. Non ordered structures were observed in agreement with the previous reports above mentioned.

### ***3.3. Capabilities and mechanisms for alkanol SUPRAS-based extractions***

SUPRASs made up of alkanols have unique structure-derived properties that offer excellent opportunities to develop remarkable applications in analytical processes. Thus, water and THF, two miscible solvents, do not mix in the SUPRAS that creating very polar and apolar differentiated microenvironments that make these solvents highly versatile as reaction and separation media. On the one hand, the environment-dependent sizes of the

aqueous cavities in the alkanol-based SUPRASs offer opportunities to exploit these solvents as materials with restricted access properties according to the molecular size of solutes. The potential exists for directly applying these SUPRASs to the enrichment of low-molecular-mass polar and ionic compounds in solid matrixes whereas high-molecular-mass matrix components are excluded. On the other hand, alkanol-based SUPRASs provide a mixed-mode mechanism for solubilisation of medium polar and non-polar solutes, namely hydrogen bonding in the surfactant polar group and hydration water, and dispersion forces in the surfactant hydrocarbon chain, thus offering an effective approach for isolating and concentrating these types of solutes from both solid and liquid matrixes. A valuable asset of these solvents is their capacity to extract solutes in the entire range of pH because n-alkanols do not dissociate in water ( $pK_a \sim 15$ ) and in this way their ordered structure is kept. Below, the versatility of alkanol-based SUPRASs as extractants is explored.

### ***3.3.1. Molecular size-based restricted access properties of supress: extraction and clean-up of polar/ionic solutes in solid matrixes***

Restricted access matrix sorbents —so-called restricted access materials (RAMs)— have been used in the past two decades<sup>39</sup> for the enrichment of drugs, endogenous substances and xenobiotics in biological fluids without the interference of proteins and other matrix components that are excluded by chemical or physical means, or a combination. The coupling of RAMs to column-switching LC systems has led to automation, simplification and speeding up of the sample-preparation process in the analysis of plasma, urine and other biological fluids.<sup>40</sup> To the best of our knowledge, no solvents having restricted access properties have been reported so far.

The capability of alkanol-based SUPRASs to behave as restricted access property solvents was assessed by extracting polar/ionic analytes with different molecular weights from food (e.g. ochratoxin A, OTA, in cereal baby food, MW=403.8) and environmental solid samples (e.g. acid red 97,



MW=698.6 and brilliant blue G, MW=825.9, in sludge) using decanol-based SUPRASs as models. Both OTA<sup>41</sup> and dyes<sup>42</sup> are considered contaminants of concern in the selected matrixes. SUPRASs produced in water/THF environments containing increasing THF percentages (v/v) and, consequently, increased vacuole sizes were tested. For comparison purposes, some solvents made up of decanol in THF, at similar amphiphile concentrations than those of SUPRASs, were also assessed as extractants. After extraction, aliquots of the corresponding extracts were directly subjected to liquid chromatographic analysis. Table 1 shows the results obtained, expressed as recoveries and the corresponding standard deviations. Some relevant data on the composition of the SUPRASs tested are also included in this table for a better understanding of the discussion that follows.

Recoveries for the target analytes were highly dependent on water/decanol molar ratios in the SUPRASs (Table 1) and, therefore, on the size of their aqueous cavities. Quantitative recoveries for OTA and Acid Red 97 were only obtained for SUPRASs containing vacuoles with water/decanol molar ratios of 7.7 (Table 1) that were large enough to allow these analytes to diffuse through them in an effective way. The size of the vacuoles did not permit the complete recovery of Brilliant Blue G, the largest size analyte tested. The importance of the size of vacuoles on recoveries is highlighted having into account that the global concentration of decanol in the SUPRAS was simultaneously decreasing as the size of the vacuole increased (Table 1). The restricted access properties of alkanol-based SUPRASs can be also see clearly from the results obtained for the enrichment of the target compounds using a specific solvent (e.g. that produced in an environment containing 30% of THF); recoveries linearly decreased with the molecular weight of analytes. Decanol in pure THF, an unordered-structure solvent, was unable to extract the target compounds from the selected matrixes (see Table 1) that proving that the presence of vacuoles in the SUPRAS was essential for analyte solubilization.

<b>Table 1. Recovery and standard deviation for ochratoxin A from cereal-based baby food and dyes from sludge using SUPRASs produced from different THF:water environments and decanol in THF</b>					
<b>SUPRAS Formation (THF, % v/v)</b>	<b>SUPRAS Composition</b>		<b>Recovery ± <sup>a</sup>Standard Deviation (%)</b>		
	<i>Decanol (mg μL<sup>-1</sup>)</i>	<i>H<sub>2</sub>O/Decanol (M/M)</i>	<i>Ochratoxin A</i>	<i>Acid Red 97</i>	<i>Brilliant Blue G</i>
<sup>b</sup> 10	0.57	0.5	23±5	–	–
<sup>b</sup> 20	0.41	1.2	45±9	18±3	–
<sup>c</sup> 30	0.28	2.6	80±1	36±1	5±3
<sup>c</sup> 50	0.16	7.7	109±4	100±1	54±1
<b>Decanol in THF (mg μL<sup>-1</sup>)</b>					
0.28			11±5	–	–
0.16			8±4	–	–

<sup>a</sup>n=3; SUPRASs made with <sup>b</sup>300 or <sup>c</sup>200 mg of decanol and 10mL of THF:water solution; sample weight: 400 mg of baby-food and 300 mg of sludge ; fortification level: 10 μg Kg<sup>-1</sup> for OTA and 1.7 mg Kg<sup>-1</sup> for dyes

The capability of alkanol-based SUPRASs to exclude high-molecular-mass matrix components typically found in food, environmental and biological samples (e.g. proteins, polysaccharides, humic substances, etc) was assessed with the aim of studying the potential of these solvents to combine analyte enrichment with sample clean-up. Similarly to RAM sorbents, both chemical and physical means to exclude the extraction of macromolecules were explored. Experiments were conducted by extracting 20 to 100 mg of pure standards of the target molecules in SUPRASs produced from 200 mg of decanol in aqueous environments containing 10 and 50% of THF, which gave SUPRAS volumes of 330 and 1437 μL, respectively.

The behaviour of proteins in the extraction process was investigated by extracting aqueous solutions containing albumin from bovine serum, albumin and lysozyme from chicken egg white and gluten from wheat. THF in the

solvent caused protein denaturation whereas the alkanol produced protein flocculation. As a result, proteins formed a white precipitate that separated from the SUPRAS under centrifugation as a thin layer at the bottom. The same white layer could be clearly observed between the insoluble matrix components and the SUPRAS after extraction and centrifugation of solid food samples such as wheat. The amount of precipitate obtained increased both with the content of protein in the sample and the volume of THF in the SUPRAS. It is inferred from these results that proteins do not incorporate into the SUPRAS and that both THF and alkanol are the components in the solvent causing their exclusion into the extracts.

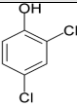
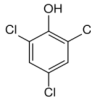
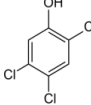
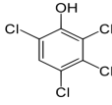
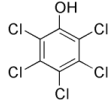
To investigate the behaviour of polysaccharides in the extraction process, two polymers with different function in living organisms, namely structure-related (i.e. chitosan, MW=50.000-190.000) and storage-related (i.e. starch, molecular weight MW non provided by the supplier) functions, were selected. Neither chitosan nor starch solubilised in the SUPRASs tested. Extractions were also carried out under experimental conditions known to enhance the solubility of chitosan (1% acetic acid) and starch (40 °C) but no extraction in the SUPRAS was observed. So, SUPRAS also acted as a RAM for polysaccharides.

The extraction of humic acids (MW=2000-500.000), a principal component of environmental samples such as soils and sediments, was SUPRAS composition-dependent. They were only partially extracted in SUPRAS containing high content of THF (e.g. those synthesized in environments containing 50% THF). So, the environment for self-assembly can be exploited to get selectivity against these macromolecules.

In summary, alkanol-based SUPRASs are good extractants for low molecular weight ionic/polar contaminants in solid food, environmental and biological samples where macromolecular matrix components are not expected to interfere. In this way, both enrichment of analytes and clean-up can be conveniently carried out in a single step.

### 3.3.2. Mixed-mode mechanisms for solute solubilization in supras: extraction of medium polar/non-polar solutes in liquid matrixes

Medium polar and non-polar analytes can be solubilised in alkanol-based SUPRAS by both hydrogen bonding and dispersion forces. Some experiments were conducted for determining the variables influencing the extraction efficiency of these solutes by SUPRASs with the aim of setting up predictable extraction schemes that avoid the very time-consuming optimization processes involved in trial and error experimentation.

<b>Table 2. Carcinogenic chlorophenols: structures, octanol:water partition coefficients, acidity constants and estimated carcinogenic potency</b>				
<b>Compound</b>	<b>Structure</b>	<b><sup>a</sup>Log Kow</b>	<b><sup>a</sup>pKa</b>	<b><sup>b</sup>IARC carcinogenic potency</b>
<b>2,4-Diclorofenol (2,4-DCP)</b>		2.9	8.1	2B
<b>2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCP)</b>		3.6	6.6	2B
<b>2,4,5-Triclorofenol (2,4,5-TCP)</b>		3.8	7.1	2B
<b>2,3,4,6-Tetraclorofenol (2,3,4,6-TTCP)</b>		4.2	5.6	2B
<b>Pentaclorofenol (PCP)</b>		4.8	4.7	2B

<sup>a</sup>Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V9.04 for Solaris  
<sup>b</sup>Possibly carcinogen to humans according to the *International Agency from Research on Cancer* (IARC)

Carcinogenic chlorophenols and aqueous matrixes were selected as models for this purpose. Selection of chlorophenols (Table 2) was based on their ability to establish hydrogen bonding and hydrophobic interactions, wide polarity range, acid-base properties, environmental significance and the need for developing simple and rapid concentration schemes that permit their quantitation below the ultra-trace levels set up by the European Union as water quality criteria in surface waters ( $0.4-1 \mu\text{g L}^{-1}$  for pentachlorophenol).<sup>43</sup> Liquid matrixes were selected in order to determine the actual concentration factors that can be achieved and study the distribution of analytes between the SUPRAS and the sample. SUPRASs were formed *in situ* (i.e. adding alkanol and THF to the water sample).

<b>Table 3. Mean recoveries along with their standard deviations (<math>R \pm SD</math>, %) <sup>a</sup> obtained in the extraction of carcinogenic chlorophenols with SUPRASs made up of different alkyl alcohols</b>					
<b>Carcinogenic chlorophenol</b>	<b>Alcohol</b>				
	<sup>b</sup> C7	<sup>B</sup> C8	<sup>b</sup> C10	<sup>c</sup> C12	<sup>d</sup> C14
	$R \pm^a SD$	$R \pm^a SD$	$R \pm^a SD$	$R \pm^a SD$	$R \pm^a SD$
<b>2,4 DCP</b>	51±2	63±3	88±5	89±1	69±1
<b>2,4,6 TCP</b>	58±2	80±3	92±3	89±2	74±1
<b>2,4,5 TCP</b>	59±5	83±4	93±1	91±1	71±2
<b>2,3,4,6 TTCP</b>	63±1	84±5	95±2	98±1	79±3
<b>PCP</b>	60±1	85±5	97±2	96±1	81±1

Spiking level:  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ; <sup>a</sup> $n = 3$ ; SUPRAS formation: 100 mg of alkyl alcohol and a mixture THF:water of 40 mL containing a percentage v/v of THF of <sup>b</sup>7.5, <sup>c</sup>10, <sup>d</sup>12.5

Table 3 shows the recoveries obtained for the target chlorophenols as a function of the length of the hydrocarbon chain of the alkanol in the interval C7-C14. Maximal extraction efficiency was achieved using intermediate hydrocarbon chains (i.e. decanol and dodecanol), which can be qualitatively interpreted on the basis that the strong of the two binding forces driving the

extraction process, namely hydrogen bonding ( $\delta_h$ ) and dispersion interactions ( $\delta_d$ ), decreases and increases, respectively, with the length of the hydrocarbon chain (Figure 4A).<sup>44</sup> Although no data were found in the literature for  $\delta_h$  and  $\delta_d$  of C12-C14 alkyl alcohols, their values are expected to continue decreasing and increasing, respectively. The Figure 4A clearly illustrates that short-chain alcohols are better proton donors compared to the larger ones, which also influences the volume of water in the pool (see equation 1). So, the results in Table 3 represent a compromise between the strong of the two forces involved in the extraction. It seems reasonably to think that other analytes in the range of polarity considered (e.g.  $\log K_{ow}$  2.9-4.8, Table 2) will behave similarly. It can be also inferred from these results that polar analytes outside this range with capacity to establish hydrogen bonds will be better extracted in SUPRASs made up of short-chain alcohols. This hypothesis was confirmed by extracting phenol ( $\log K_{ow}$  1.5); recoveries in a heptanol-based SUPRAS ( $70\pm 4\%$ ) were higher than those in solvents made up of decanol ( $35\pm 2\%$ ) or tetradecanol ( $22\pm 3\%$ ).

The influence of the composition of the solvent on the extraction efficiency of chlorophenols was evaluated. For this purpose, decanol-based SUPRASs produced from aqueous solutions containing variable percentages of THF (2.5-30%, v/v) were tested. According to equation 3, the volume of SUPRAS is exponentially dependent on the percentage of THF, so not only recoveries but also concentration factors should be taken into account as discussing and selecting this variable. Table 4 shows the results obtained. Recoveries were maximal at THF percentages in the range around 7.5-15% whereas actual concentration factors (i.e.  $ACF = \text{Recovery} \times V_{\text{sample}}/V_{\text{SUPRAS}}$ ) progressively decreased for percentages of THF above 7.5%. So a solvent produced from an environment containing 7.5% of THF was considered optimal for extraction of chlorophenols from surface waters.

**Table 4. Mean recoveries and standard deviations ( $R \pm SD$ , %) and actual concentration factors (ACFs) obtained for carcinogenic chlorophenols as a function of the percentage of THF used for SUPRAS production**

Carcinogenic chlorophenol	THF (% v/v)						
	2.5	5	7.5	10	15	20	30
	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>b</sup> $R \pm SD$ (ACF)
<b>2,4 DCP</b>	80±1 (245)	80±1 (219)	88±5 (215)	92±1 (201)	88±1 (152)	83±1 (113)	47±2 (39)
	84±2 (257)	88±3 (241)	92±3 (225)	95±2 (207)	99.2±0.4 (172)	88±1 (120)	52±2 (43)
	92±1 (282)	92±2 (252)	96±1 (235)	96±1 (210)	93±1 (161)	91±2 (124)	58±3 (48)
<b>2,4,6 TCP</b>	92±1 (282)	92±1 (252)	95±2 (233)	99±1 (216)	92±1 (159)	88±2 (120)	59±3 (49)
<b>2,4,5 TCP</b>	93±1 (285)	94±2 (257)	97±2 (237)	97±1 (212)	104±1 (180)	99±1 (135)	76±4 (63)
<b>2,3,4,6 TTCP</b>	93±1 (285)	94±2 (257)	97±2 (237)	97±1 (212)	104±1 (180)	99±1 (135)	76±4 (63)
<b>PCP</b>	93±1 (285)	94±2 (257)	97±2 (237)	97±1 (212)	104±1 (180)	99±1 (135)	76±4 (63)

Spiking levels: <sup>a</sup> 2µg L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> 4 µgL<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> n= 3; decanol= 100 mg, volume of THF+water: 40mL

To gain some insight about the influence of solvent composition on extraction recovery, the Hildebrand solubility parameter ( $\delta$ ) corresponding to the two sites expected to compete for solubilising chlorophenols, namely decanol:water in the SUPRAS and THF:water in the equilibrium solution, was represented as a function of the percentage of THF used for SUPRAS production (Figure 4B).<sup>44</sup> The parameter  $\delta$ , that indicates the relative solvency behaviour of a specific solvent and reflects the total van der Waals forces resulting from the additive effect of dispersion, polar and hydrogen bonding forces, progressively increased and decreased for the SUPRAS and equilibrium solution, respectively, as the THF percentage increased. The solvency behaviour of the two solubilisation sites was similar at percentages of THF around 30% (Figure 4B) which caused the recoveries for chlorophenols to significantly decrease (Table 4) owing to distribution of analytes between them. In the optimal interval for extraction of

chlorophenols (7.5-15% THF), the dispersion forces in the SUPRAS ( $\delta_d = 16.95-16.7 \text{ MPa}^{1/2}$ ) were higher than those in the equilibrium solution ( $\delta_d = 15.7-15.8 \text{ MPa}^{1/2}$ ), whereas hydrogen bonding forces were higher for the latter [ $\delta_h(\text{SUPRAS}) = 19.7-22.9 \text{ MPa}^{1/2}$ ,  $\delta_h(\text{equilibrium solution}) = 39.7-37.1 \text{ MPa}^{1/2}$ ], so it is reasonable to conclude that, although hydrogen bonding contributes to the extraction, dispersion forces were the major ones driving the process. The dependence found for extraction of chlorophenols with pH also confirmed this conclusion; recoveries significantly decreased at pH 9 (see pKa values in Table 2) as a result of the higher solubilisation of the ionic form in the equilibrium solution (e.g. recoveries were  $47 \pm 1$ ,  $8.51 \pm 0.01$ ,  $41.9 \pm 0.4$ ,  $2.7 \pm 0.2$  and  $14.3 \pm 0.3\%$  for 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, 2,4,5-TCP, 2,3,4,6-TCP and PCP, respectively). It is predictable from this study that SUPRASs produced at low concentrations of THF will be better suited for extraction of medium polar and non polar analytes owing to the different solvency behaviour of SUPRAS and the equilibrium solution (Figure 4B). Also it is predictable that aqueous back extraction of the ionic form of solutes from SUPRAS will be successful which should facilitate the use of SUPRAS-based treatments prior to techniques as capillary electrophoresis. A valuable feature of the SUPRASs produced at low percentages of THF is that they provide the highest preconcentration factors according to equation 3.

The effect of varying the volume of the SUPRAS selected (i.e. that produced in 7.5% of THF) on the extraction efficiency of chlorophenols was assessed. For this purpose, volumes of SUPRAS between 61 and 1209  $\mu\text{L}$  were *in situ* prepared from amounts of decanol ranging from 40 to 800 mg (see equation 3). Table 5 shows the results obtained. As usual, recoveries progressively increased and then kept constant as the volume of solvent used for extraction increased, whereas actual concentration factors steadily decreased. A solvent volume of 151  $\mu\text{L}$  prepared from 100 mg of decanol, was selected as optimal for extraction of chlorophenols.



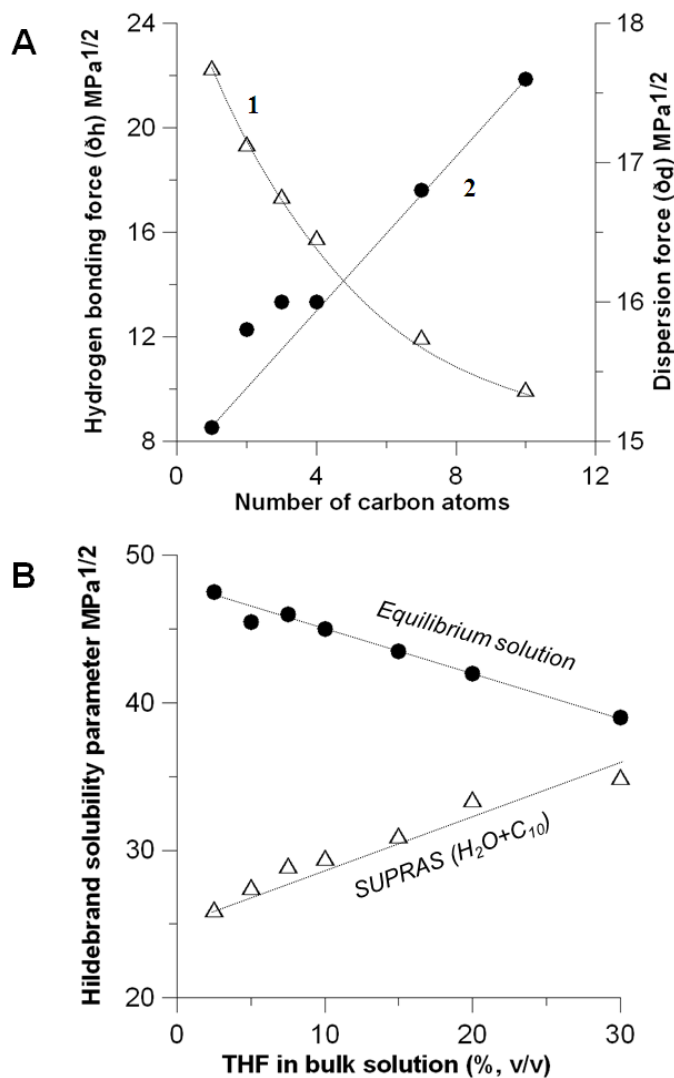


Figura 4. (A) Variation of (1) hydrogen bonding and (2) dispersion forces as a function of the number of carbon atoms in the alkanol and (B) variation of the Hildebrand solubility parameter as a function of the percentage of THF in the bulk solution for SUPRAS and the equilibrium solution.

**Table 5. Mean recoveries along with their standard deviations ( $R \pm SD$ , %) and actual concentration factors (ACF) obtained for carcinogenic chlorophenols as a function of the amount of decanol in the SUPRAS**

Carcinogenic chlorophenol	Decanol (mg)					
	40	60	100	200	400	800
	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>a</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>b</sup> $R \pm SD$ (ACF)	<sup>b</sup> $R \pm SD$ (ACF)
<b>2,4 DCP</b>	62±7 (379)	68±10 (272)	88±5 (251)	92±1(13)	97±1 (59)	96±1 (29)
<b>2,4,6 TCP</b>	66±8 (404)	78±8 (318)	92±3 (225)	94±3 (115)	98±2 (60)	97±1 (30)
<b>2,4,5 TCP</b>	69±5 (422)	85±8 (347)	96±1 (235)	95±4 (116)	95±2 (58)	98±2 (30)
<b>2,3,4,6 TTCP</b>	71±6 (434)	84±6 (343)	95±2 (233)	96±3 (117)	97±3 (59)	97±1 (30)
<b>PCP</b>	65±7 (398)	81±7 (330)	97±2 (237)	97±3 (119)	97±1 (59)	101±1 (31)

Spiking levels: <sup>a</sup> 2µg L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> 8 µg L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> n = 3; THF =7.5 % , water sample volume: 37mL

Equilibrium conditions for extraction were rapidly attained (3 min) and variables such as the ionic strength (NaCl concentration up to 1M) and temperature (up to 50 °C) did not affect the extraction efficiency of analytes.

Because of the simplicity and rapidity of the microextraction of chlorophenols with alkanol-based SUPRAS, the possibility of combining this sample treatment with LC-DAD to develop a sensitive and selective method, able to quantify carcinogenic chlorophenols at the quality criteria established by the EU in surface waters, was explored. There are a number of microextraction strategies in literature for analysis of chlorophenols in waters, mainly based on SPME or LPME coupled to GC-MS or LC-UV, that allow the detection of PCP below legislative limits. Main drawbacks of these approaches are long extraction times— from 60 min<sup>45,46</sup> to 120min<sup>47</sup>— high standard deviations (e.g. variation coefficients of 60.5% for 2,3,4,5-TCP)<sup>46</sup>,

and low absolute recoveries (e.g. 28.7-90.6%)<sup>48</sup> which are frequently dependent on matrix components (e.g. absolute recoveries of 68.9, 72.7 and 99.0 were reported for 2-CP in tap water, river water and urine at 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  level)<sup>47</sup>. Although GC coupled to MS or electron capture detection are by far the most sensitive techniques for the determination of chlorophenols, the need for derivatization increases the time and complexity for sample preparation and this fact has fostered the use of LC-UV which offers adequate sensitivity and selectivity.

Calibration curves for the target chlorophenols were run using standard solutions prepared in methanol since no differences in peak areas or retention times were observed for the analytes injected in organic solvent or SUPRAS. Linear ranges were obtained in the interval 50-2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  with correlation coefficients ranging between 0.9992 and 0.9998. Instrumental detection (LODs) and quantification (LOQs) limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively, and were similar for all chlorophenols, namely 25 and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Method quantitation limits were calculated from instrumental limits and actual concentration factors and they were between 0.21 and 0.23  $\mu\text{g L}^{-1}$ . So, the method permitted the quantification of chlorophenols below the ultra-trace level proposed by UE as water quality criteria (0.4-1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in surface water. Recoveries for CCPs varied between 88% and 97%, in the whole range of concentrations tested ( $\sim$ 0.5-50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) with standard deviations in the interval 1-6%.

The possible interference of matrix components that could elute with chlorophenols was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves ( $n = 7$ ) obtained from standards in distilled water with those obtained from seawater and river water, fortified with known amounts of CCPs, and run using the whole procedure. The slopes of the calibration curves performed in distilled water were  $12874 \pm 146$ ,  $12846 \pm 96$ ,  $13060 \pm 128$ ,  $10324 \pm 104$ ,  $9683 \pm 269$ ,  $\text{mV L } \mu\text{g}^{-1}$  for 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, 2,4,5-TCP, 2,3,4,6-TTCP and PCP, respectively. The difference between these slopes and those obtained from environmental samples were found to be not

statistically significant by applying an appropriate Student's *t* test<sup>49</sup>. The calculated *t*-values were in the range 0.4–2.1 and were below the critical *t*-value (3.17), being significance established at 0.01 levels. Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of the target compounds.

The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent fortified samples at a level of 2 µg L<sup>-1</sup> using seawaters (*n* = 2) and river waters (*n* = 2). The values, expressed as relative standard deviation (R.S.D.), were between 2% and 8% for the five CCPs.

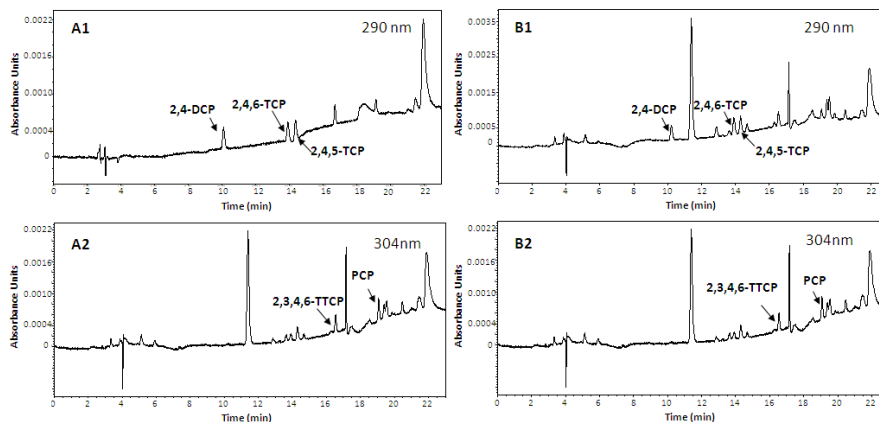
**Table 6. Recoveries (%) ±standard deviation (*n* = 3) obtained after spiking natural water samples with carcinogenic chlorophenols at different levels (target analytes were not detected in any sample)**

Sample Location	2,4-DCP	2,4,6-TCP	2,4,5-TCP	2,3,4,6-TTCP	PCP
River Guadalquivir, (site 1) <sup>a</sup>	84±1	93±1	89±1	90±1	89±1
River Guadalquivir, (site 2) <sup>b</sup>	96±2	98±2	90±6	92±5	91±4
River Guadajoz <sup>c</sup>	91±4	96±6	85±5	84±1	92±1
Navallana reservoir <sup>a</sup>	92±5	96±1	97±2	99±1	93±1
Los Álamos beach <sup>b</sup>	91±1	94±3	96±1	95±1	92±1
La Malagueta beach <sup>c</sup>	93±4	87±5	88±4	80±1	85±1
Puerto de Santa María beach <sup>d</sup>	88±1	96±1	98±1	95±1	95±1

Sample spiking levels: <sup>a</sup> 2 µg L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> 5 µg L<sup>-1</sup>, <sup>c</sup> 1 µg L<sup>-1</sup>, <sup>d</sup> 0.5 µg L<sup>-1</sup>

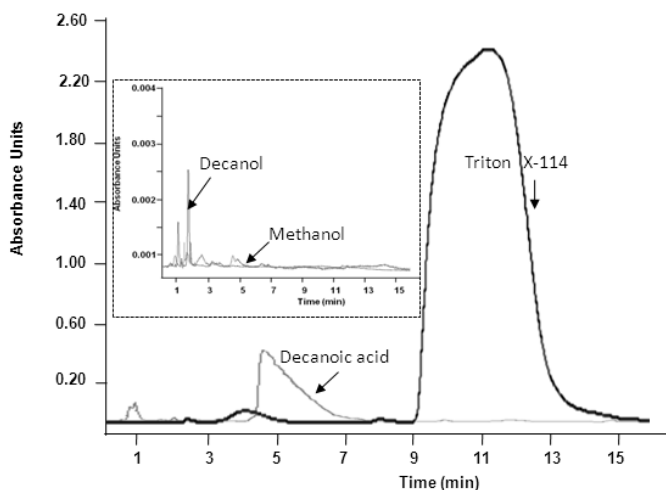
The method developed was applied to the determination of CCPs in samples collected from two rivers, a reservoir and seawater from three beaches. Any of the samples analysed was contaminated with CCPs. Table 6 shows the recoveries obtained after spiking the samples with CCPs in the range 0.5-5 µg L<sup>-1</sup>; they varied between 84 and 99% with relative standard

deviations in the interval 1-7%. Figure 5 shows the chromatograms obtained at two wavelengths from a standard solution and a fortified beach sample. No interference from matrix components were detected for any of the samples analysed.



**Figura 5.** UV chromatograms obtained from (A) a standard solution of carcinogenic chlorophenols in methanol at  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  each and (B) a sample collected in the “Puerto de Santa María” beach fortified at  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  of CCPs. Wavelengths: (1) 290 and (2) 304 nm

A valuable asset of alkanol-based SUPRASs is the negligible absorbance and fluorescence of the amphiphiles making them up, which facilitates chromatographic determinations. Figure 6 compares as an example the chromatograms obtained from the injection of methanol, and SUPRASs made up of decanol, decanoic acid and triton X-100. The chromatogram from decanol is similar to that obtained from methanol whereas those obtained from the other SUPRASs show chromatographic peaks that prevent many solutes from being determined owing to coelution problems.



**Figura 6.** UV Chromatogram at 230 nm showing background peaks coming from methanol and SUPRASs made up of decanol and decanoic acid both at 10% THF v/v in bulk solution and of Triton-X114 (5% in water, room temperature). Chromatographic conditions: Supelcosil LC-PAH analytical column (particle size 3  $\mu\text{m}$  particle size, i.d. 3 mm, length 10 cm); mobile phase of water (A) and acetonitrile (B) with 50% B isocratic conditions for 10 minutes and then gradient until 100% B in one minute, flow rate 0.6 mL  $\text{min}^{-1}$ ; column temperature 30°C; injection volume 3  $\mu\text{L}$ .

#### 4. CONCLUSIONS

Although the phenomenon of coacervation has been studied during the last 50 years and it might be considered mature, the nature of coacervates continue as a poorly understood state of matter due to the lack of systematic studies with modern techniques. Because of the delicate nature of the network structure of coacervates, many artifacts have prevented in the past from obtaining accurate electron microscopy images and, consequently, structures. A comprehensive understanding of such fluids is essential to exploit them in a rational way in a number of applications.

In this work, environment-responsive supramolecular solvents made up of coacervate droplets with inverted hexagonal structures are, to the best of our knowledge, for the first time reported. The information gained through fundamental studies has permitted to use these SUPRASs as solvents with restricted access properties, a feature only available for solid materials so far. These properties permit to have RAM extractants for direct isolation of low-molecular analytes from solid matrices (e.g. food and sludge) without the interference of high-molecular mass matrix components.

An essential characteristic of SUPRASs is that they remain in thermodynamic equilibrium with the environment in which the self-assembly of amphiphiles occurred and from which separated. So, in order to establish comprehensive and efficient extraction schemes it is essential to know the types of interactions offered to the solute by both the SUPRAS and the equilibrium solution. Here, dispersion forces, hydrogen bonding and Hildebrand solubility parameters were considered to explain the distribution of carcinogenic chlorophenols between the SUPRAS and the equilibrium solution and gain basic understanding to predict the extraction behaviour of other solutes from liquid matrixes.

The applications here developed have proved that alkanol-based SUPRAS worked with high performance in analytical extractions involving real liquid (e.g. beach, river and reservoir) and solid (e.g. food and sludge) matrixes containing solutes in a wide polarity range (e.g. ionic, polar, medium polar and non-polar).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2008-01068), the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151) and FEDER. A. Ballesteros-Gómez is also grateful to Spain's MEC for award of a doctoral fellowship (Grant AP2005-4275).

**REFERENCES**

- [1] Torimoto, T.; Tsuda, T.T.; Okazaki, K-I. *Adv. Mater.* 2010, 22, 1196.
- [2] Hu, S.Q.; Zhang, X.D.; Xu, M.; Sun, L. *Progress Chem.* 2011, 23, 731.
- [3] Moniruzzaman, M.; Masahiro, G. *J. Chem. Eng. Japan* 2011, 44, 370.
- [4] Zhao, H. *J. Chem. Tech. Biotech.* 2010, 85, 891.
- [5] Smith, E.L.; Abbott, A.P.; Griffin, J.; Harris, R.C.; O'Connor, C.; Ryder, K.S. *Circuit World* 2010, 36, 3.
- [6] Zakeeruddin, S.M.; Graetzel, M. *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 2187.
- [7] Poole, C.F.; Poole, S.K. *J. Chromatogr. A* 2010, 16, 2268.
- [8] Eckert, C.A.; Liotta, C.L.; Bush, D.; Brown, J.S.; Hallett, J.P. *J. Phys. Chem.* 2004, 108, 18108.
- [9] Yu, M.S.; Curran, D.P.; Nagashima, T. *Org. Lett.* 2005, 7, 3677.
- [10] Ariga, K.; Kunitake, T. *Supramolecular Chemistry, Fundamentals and Applications*; Springer: Berlin, 2006.
- [11] Armstrong, G.; Buggy, M. *J. Mater. Sci.* 2005, 40, 547.
- [12] Kato, T.; Mizoshita, N.; Kishimoto, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 38.
- [13] Brammer, L. *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 476.
- [14] Steed, J.W.; Turner, D.R.; Wallace, K.J. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; John Wiley and Sons: Chichester, 2007.
- [15] Hinze, W.L.; Pramauro, E. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1993, 24, 133.
- [16] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Moreno-Cordero, B.; Pérez-Pavon, J.L.; García-Pinto, C.; Fernández-Laespada, E.; *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 251.
- [17] Rubio, S. ; Pérez-Bendito, D. *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 470.



- [18] Yazdi, A.S. *Trends Anal. Chem.* 2011, 30, 918.
- [19] Saitoh, T.; Hinze, W.L. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2520.
- [20] Jin, X.; Zhu, M.; Conte, E.D. *Anal. Chem.* 1999, 71, 514.
- [21] Ruiz, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 2006, 78, 7229.
- [22] Casero, I.; Sicilia, D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 1999, 71, 4519.
- [23] Ruiz, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 2007, 79, 7473.
- [24] Menger, F.M.; Sykes, B.M. *Langmuir*, 1998, 14, 4131.
- [25] Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatography A* 2009, 1216, 530.
- [26] Bosch-Ojeda, C.; Sánchez-Rojas, F. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 759.
- [27] Paleólogos, E.K.; Giokas, D.L.; Karayannis, M.I. *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 426.
- [28] Ballesteros-Gómez, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; D. *Anal. Chim. Acta* 2010, 677, 108..
- [29] Pelesko, J.A. *Self-Assembly: The Science of Things that Put Themselves Together*; Chapman and Hall/CRC: London, 2007, Chapter 4.
- [30] Draper, N.R.; Smith, H. *Applied Regression Analysis*; Willey-Interscience: New York, 1998, pp. 505-553.
- [31] Boyd, B.J.; Rizwan, S.B.; Dong, Y-D.; Hook, S.; Rades, T. *Langmuir* 2007, 23, 12461.
- [32] Yaghmur, A.; Glatter, O. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 2009, 333, 147.
- [33] Espinosa-Andrews H.; Sandoval-Castilla, O.; Vázquez-Torres, H.; Vernon-Carter, E.J.; Lobato-Calleros, C. *Carbohydr. Polym.* 2010, 79, 541.
- [34] Fendler, J.H.; *Axx. Chem. Res.* 1976, 9, 153.
- [35] Wong, M.; Thomas, J.K.; Grätzel, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 2391.

- [36] Seddon, J.M. *Biochim Biophys. Acta* 1990, 1031, 1.
- [37] Piñeiro, A.; Brocos, P.; Amigo, A.; Pintos, M.; Bravo, R. *J. Solution Chem.* 2002, 31, 369.
- [38] Ali, A.; Nain, A.K.; Sharma, V.K.; Ahmad, S. *Indian J. Pure Appl. Physics*, 2004, 42, 666.
- [39] Hagestam, I.H.; Pinkerton, T.C. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1757.
- [40] Sadílek, P.; Satínský, D.; Solich, P. *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 375.
- [41] Duarte, S.C.; Pena, A.; Lino, C.M. *Food Microbiol.* 2010, 27, 187.
- [42] Song, W.X.; Qing, L.H. *Desalin. Water Treat.* 2011, 29, 10.
- [43] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy; Official J. *Eur. Union*, 2008, 348, 84.
- [44] Burke, J. Solubility Parameters: Theory and Application. In *The Book and Paper Group Annual*; The American Institute for Conservation, 1984, Vol. 3. Available on <http://cool.conserva-tion-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v03/index.html>
- [45] López-Jiménez, F.J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 2008, 1195, 25.
- [46] Ribeiro, A.; Neves, M.H.; Almeida, M.F.; Alves, A.; Santos, L. *J. Chromatogr. A* 2002, 975, 267.
- [47] Kawaguchi, M.; Ishii, Y.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H. *Anal. Chim. Acta* 2005, 533, 57.
- [48] Fattahi, N.; Assadi, Y.; Reza, M.; Hosseini, M.; Jahromi, E. *Z. J. Chromatogr. A* 2007, 1157, 23.
- [49] Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campaña, A. M.; Alés-Barrero, F.; Jiménez-Linares, C.; Román-Ceba, M. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 471.



# Capítulo 6

---

*Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles. Study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples*

---



---

**Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles. Study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples\***

---

**ABSTRACT**

In this work, magnetic nanoparticles (MNPs) coated with hemimicelles of alkyl (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>) carboxylates, which have traditionally been used to prepare ferrofluids for technological applications, were used for the first time to extract organic contaminants from environmental water samples. The nanoparticles were coated by following a simple, rapid procedure (30 min at 85 °C) that uses commercially available magnetite of 20–30 nm mean particle diameter. The strong chemical bonding between the surfactant and magnetite relative to the electrostatic forces involved in conventional hemimicelle-based sorbents precludes leaching of the surfactant, and facilitates its reuse and the obtainment of surfactant-free extracts. Tetradecanoate hemimicelles were used here to extract carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (CPAHs) prior to analysis by liquid chromatography (using a C<sub>18</sub> Supelcosil LC-PAH column and a gradient elution program with water and acetonitrile) and fluorescence detection. The procedure involved stirring filtered aqueous samples (350 mL) with 200 mg of tetradecanoate-coated MNPs for 15 min, isolating the sorbent with a Nd-Fe-B magnet and eluting the CPAHs with a mixture of acetonitrile and tetrahydrofuran. The extraction efficiency was not influenced by salt concentrations up to 1 M and pH values over the range 2.5–9. The preconcentration factor was 116. No clean-up of the extracts was

**\*A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio  
*Anal. Chem.* 81 (2009) 9012–9020**

needed and the method proved matrix-independent. The limits of quantitation thus obtained, 0.2–0.5 ng L<sup>-1</sup>, meet the stringent water quality requirements established by the recently amended European Water Framework Directive 2000/60/EC and also the US EPA for the determination of CPAHs in surface and ground waters. The proposed method was successfully applied to the determination of these pollutants in surface and ground environmental water samples collected from various places in southern Spain. Recoveries from samples spiked with CPAHs at concentrations of 1–10 ng L<sup>-1</sup> ranged from 85 to 94%, and relative standard deviations from 1 to 7%. CPAHs were only present in the sample from Navallana reservoir, at concentrations over the range 0.42–0.96 ng L<sup>-1</sup>.

## **1. INTRODUCTION**

---

Solid-phase extraction (SPE) continues to be the leading technique for the extraction of pollutants in aquatic systems.<sup>1</sup> The use of SPE in this field has been fostered by the development of new sorbent materials (*e.g.* molecularly imprinted polymers, carbon nanotubes, hemimicelles, admicelles) and formats [*e.g.* solid phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE)], which have greatly expanded the scope and experimental convenience of this extraction technique.

Hemimicelles and admicelles are flexible materials with unique features for SPE.<sup>2–4</sup> Hemimicelles are tepee-like monolayers of ionic surfactants adsorbed onto the surface of oppositely-charged mineral oxides. Admicelles are roughly spherical aggregates formed by adsorption of an additional surfactant on hemimicelles via hydrocarbon chain interactions. By virtue of the amphiphilic character of surfactants, hemimicelles and admicelles possess regions of disparate polarity allowing the solubilisation of solutes of highly different nature. Thus, surfactant hydrocarbon chains solubilise hydrophobic pollutants; while surfactant polar groups can retain solutes through hydrogen bonding,  $\pi$ -cation and/or electrostatic interactions; and amphiphilic compounds are strongly retained by mixed aggregate formation. A number

of pollutants including surfactants,<sup>2,4-6</sup> chlorophenols,<sup>6,7</sup> phthalates,<sup>6</sup> pesticides,<sup>3,8</sup> endocrine disrupters,<sup>9</sup> drugs<sup>10</sup> and perfluorinated compounds<sup>11</sup> have been successfully extracted from surface, ground and waste water by exploiting the previous interactions. The multiple retention mechanisms that may come into play make hemimicelles and admicelles excellent sorbents for multiclass pollutant extraction (*e.g.* pesticide multiresidue analysis<sup>12</sup>). Most of their uses in this field involve alumina or silica as the mineral oxide and an alkyl sulphate or quaternary ammonium salt as the surfactant.

The outstanding properties of hemimicelles and admicelles warrant research into ways of overcoming their intrinsic and format-related drawbacks, which have so far restricted their applicability or experimental convenience. The greatest disadvantages of these sorbents arise from disruption of surfactant aggregates during analyte elution; this produces extracts containing high surfactant concentrations that may suppress ionization in MS or interfere with MS, UV or fluorescence detection. Also, the extracts are incompatible with separation techniques such as gas chromatography and capillary electrophoresis. On the other hand, hemimicelles/admicelles are preferentially used in cartridge format, which results in slow extraction and low breakthrough volumes despite their widespread use in SPE.

In this work, we assessed the ability of new surfactant–mineral oxide sorbents (*viz.* alkyl carboxylate–magnetite mixtures) to circumvent the above-described shortcomings. MNPs coated with single or double layers of alkyl carboxylic acids have been widely used to prepare ferrofluids, which are stable colloid suspensions of magnetic nanoparticles in a carrier liquid. Ferrofluids are widely used in dynamic loudspeakers and also in sealing, computer hardware, aerospace and mechanical engineering applications;<sup>13–14</sup> lately, they have also attracted much attention among biomedical and biological researchers.<sup>15–17</sup> The coating of magnetite with single layers of alkyl carboxylates occurs via the formation of bidentate mononuclear complexes between carboxylate groups and iron atoms;<sup>18,19</sup> this facilitates the dispersion of magnetite in nonpolar solvents.<sup>20–22</sup> Unlike conventional hemimicellar

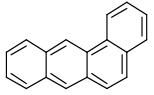
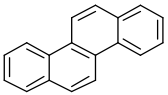
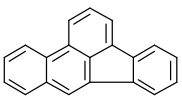
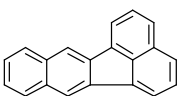
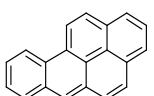
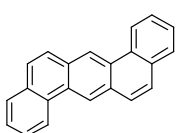
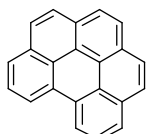
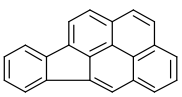


sorbents generated by electrostatic interaction, alkyl carboxylate-coated MNPs possess excellent chemical stability and hence the potential for reusing and the obtainment of surfactant-free extracts. In addition, magnetic SPE affords straightforward extraction even with large sample volumes.

Magnetic SPE initially used MNPs coated with silica or charcoal<sup>23</sup> and, more recently, polymers<sup>24</sup> to avoid alteration of the magnetic properties of magnetite or its oxidation below pH 4. These coatings were subsequently functionalized with organosilanes and/or affinity ligands in order to enable the selective extraction of organic contaminants<sup>25</sup> and metals.<sup>26,27</sup> Also, alkyl quaternary ammonium salts were physisorbed onto MNPs, both uncoated<sup>28</sup> and coated with silica,<sup>29</sup> and sodium dodecyl sulfate was physisorbed on alumina-coated MNPs,<sup>30</sup> in order to obtain hemimicelles and admicelles; this approach, however, failed to produce surfactant-free extracts.

In this work, we assessed the ability of MNPs coated with alkyl (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>) carboxylates to extract and concentrate carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (CPAHs) from surface waters. Their structures, octanol–water distribution constants and estimated carcinogenic potency are shown in Table 1. The US EPA has set highly restrictive limits for CPAHs in surface and ground waters (3.8 ng L<sup>-1</sup> each)<sup>31</sup> as a criterion for water quality; on the other hand, the European Union has established maximum allowable concentration limits of 50 ng L<sup>-1</sup> for benzo(*a*)pyrene, 30 ng L<sup>-1</sup> for the combination of benzo(*b*)fluoranthene and benzo(*k*)fluoranthene, and 2 ng L<sup>-1</sup> for benzo(*ghi*)perylene and indene(1,2,3-*cd*)pyrene.<sup>32,33</sup> Few currently available SPE and liquid–liquid extraction (LLE) methods provide the limits of quantitation (LOQs) required to determine such low levels.<sup>34,35</sup> Also, they involve labour-intensive, time-consuming procedures; use large sample volumes (1–50 L) and substantial amounts of hazardous organic solvents (in LLE); and require evaporation and clean-up prior to LC-FL. Several microextraction techniques have been proposed to simplify the sample treatment involved. SPME–GC–MS/MS<sup>36</sup> and SBSE–LC–FL<sup>37</sup> afford CPAH LOQs of 0.20–0.98 and 0.7–4.9 ng L<sup>-1</sup>, respectively.

**Table 1. Structure, octanol:water partition coefficient and estimated carcinogenic potency of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons**

PAH	Structure	Log $K_{ow}$ <sup>a</sup>	Carcinogenic potency <sup>b</sup>
Benzo( <i>a</i> )anthracene, BaA		5.91	2B
Chrysene, Chry		5.91	2B
Benzo( <i>b</i> )fluoranthene, BbF		6.40	2B
Benzo( <i>k</i> )fluoranthene, BkF		6.40	2B
Benzo( <i>a</i> )pyrene, BaP		6.40	1
Dibenzo( <i>a,h</i> )anthracene, DahAn		7.14	2A
Benzo ( <i>ghi</i> ) perylene <sup>c</sup> , BghiP		6.89	3
Indeno(1,2,3- <i>cd</i> )pyrene, IP		6.89	2B

<sup>a</sup> Calculated with the software Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V9.04 for Solaris

<sup>b</sup> IARC classification: carcinogenic to humans (1), probably carcinogenic to humans (2A), possibly carcinogenic to humans (2B), (3) not classifiable as to carcinogenicity to humans

<sup>c</sup> BghiP was included in the study despite its being deemed noncarcinogenic owing to its low legal limits

The extraction times involved, however, are too long (60–120 min) and recoveries are influenced by CPAH concentration<sup>37</sup> and sample matrix.<sup>36</sup> Alkyl carboxylate-coated MNPs might provide a simple, expeditious and inexpensive choice for the routine quantitation of CPAHs in surface and ground waters at the ultra-low levels required by existing legislation. In this work, the variables governing the coating process and extraction step were optimised, and compatibility between the sorbent and the additives used to prevent adsorption of CPAHs on container surfaces was assessed. To the best of our knowledge, this is the first time hemimicellar sorbents providing surfactant-free extracts are used for the extraction of contaminants.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

---

### **2.1. Chemicals**

All chemicals were analytical reagent-grade and used as supplied. Fe (II,III) oxide magnetic nanoparticles of mean diameter 20–30 nm and sodium alkyl (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>) carboxylates were obtained from Sigma (Steinheim, Germany). The target compounds chrysene (Chry), benzo(*ghi*)perylene (BghiP), benzo(*b*)fluoranthene (BbF), benzo(*a*)pyrene (BaP), dibenzo(*a,b*)anthracene (DahAn) and indeno(*1,2,3-cd*)pyrene (IP) were purchased from Sigma–Aldrich, while benzo(*a*)anthracene (BaA) and benzo(*k*)fluoranthene (BkF) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Tetrabutylammonium bromide (TBABr) was purchased from Sigma. Tetrahydrofuran (THF), methanol (MeOH) and LC-grade acetonitrile (ACN) were supplied by Panreac (Sevilla, Spain) and ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Stock standard solutions containing each individual CPAH at a concentration of 200 mg L<sup>-1</sup> were prepared in acetonitrile and stored at 4 °C in the dark. Working-strength solutions containing a mixture of CPAHs were made by appropriate dilution of the stock solutions with a 50:50 v/v mixture of ACN and THF.

## 2.2. Instrumentation

The liquid chromatographic system used (Breeze HPLC, Waters, Milford MA) consisted of a 1525 binary pump, a 717plus automatic injector, a 1500 series column heater, a 2475 multiwavelength fluorescence detector and a 2898 photodiode array detector. The stationary-phase column employed for the analysis of CPAHs was a Supelcosil LC-PAH model (particle size 3  $\mu\text{m}$ , internal diameter 3 mm, length 10cm). RW-14-Basic mechanical stirrers from Ika (Staufen, Germany) were used to facilitate extraction. An Nd-Fe-B magnet (*viz.* a disc 2 cm in diameter and 1 cm thick from Farplas, S.L., Barcelona, Spain) was used to separate MNPs from the samples after extraction.

## 2.3. Optimisation of the coating of MNPs with alkyl carboxylates

The amount of alkyl carboxylate chemisorbed onto the magnetic nanoparticles (200 mg) was determined under variable experimental conditions as regards the length of the alkyl chain ( $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{18}$ ), amount of surfactant (0.01–0.5 mmol) and reaction time used (1–120 min). Nanoparticles were coated in a 50 mL glass beaker by heating a mixture of MNP, surfactant and 25 mL of distilled water at 85 °C. Then, coated MNPs were separated from the reaction medium by means of an Nd-Fe-B magnet and washed five times with methanol or ethanol in order to remove physisorbed surfactant. The amounts of surfactant present at equilibrium and in the successive washing solutions were determined by LC-UV, using a Supelcosil ABZ+PLUS column (particle size 5  $\mu\text{m}$ , inner diameter 4.6 mm, length 15 cm) and detection at 205 nm. The mobile phase consisted of water (A) containing 60%, 85%, 90% and 95% acetonitrile (B) for the analysis of  $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{14}$ ,  $\text{C}_{16}$  and  $\text{C}_{18}$  alkyl-carboxylate sodium salts, respectively. The flow rate was set at 1 mL  $\text{min}^{-1}$  and the column temperature at 40 °C. Calibration curves were obtained over the concentration range 0.05–20 mg  $\text{mL}^{-1}$ , using an injected volume of 2.5  $\mu\text{L}$ .

## **2.4. Synthesis of tetradecanoate-coated MNPs**

The following coating procedure was used to prepare the SPE sorbent for extraction of CPAHs: an amount of 200 mg of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  was mixed with 50 mg of tetradecanoic acid sodium salt in 25 mL of distilled water. The mixture was homogenized by hand and allowed to stand in a thermostatic bath at 85 °C for 30 min. Following chemisorption,  $\text{C}_{14}$ -coated MNPs were separated from the equilibrium solution by means of an Nd-Fe-B magnet and washed three times with 4 mL of methanol or ethanol to remove excess surfactant. The SPE material thus obtained was stored in a closed glass container at 4 °C until use. The amount of material obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /sodium tetradecanoate/water proportion.

## **2.5. Determination of CPAHs in Surface and Ground Waters**

### **2.5.1. Sample Collection and Preservation**

Water samples were collected in dark glass containers from a well (Almodóvar), two rivers (Guadalquivir and Rabanales), a reservoir (Navallana) and the Mediterranean Sea (Los Álamos and La Malagueta beaches) in January 2009; all sampling sites were located in either Córdoba or Málaga (southern Spain). Immediately upon collection, the samples were spiked with a 50 mg  $\text{L}^{-1}$  concentration of tetrabutylammonium bromide (TBABr) in order to prevent adsorption of CPAHs onto container surfaces. This was followed by passage through filters of 0.45  $\mu\text{m}$  pore size from Watman GF/F Osmonics (France) in order to remove suspended solids, acidification to pH ~4.5 with 12 M hydrochloric acid and storage at 4 °C until analysis.

### **2.5.2. Magnetic Solid Phase Extraction**

A volume of sample of 350 mL at pH ~4.5 containing 50 mg  $\text{L}^{-1}$  TBABr and 200 mg of  $\text{C}_{14}$ -coated MNPs were mixed in a 500 mL glass cone (Pobel,

S.A., ref. no 912003) prior to extraction with a mechanical stirrer at 500 rpm for 15 min. Then, MNPs were isolated by placing an Nd-Fe-B magnet in the bottom of the cone and pouring the solution away. Excess water retained on MNPs (~100  $\mu\text{L}$ ) was removed by passing a nitrogen stream at ~1 bar for 2 min. The sorbent was then washed twice with 1 mL first and 2 mL then of a 50:50 v/v THF:ACN mixture to elute CPAHs. The eluate was filtered through nylon mesh of 0.22  $\mu\text{m}$  pore size and a 6  $\mu\text{L}$  aliquot directly injected into the LC-FL system for analysis.

### **2.5.3. Liquid Chromatography/Fluorescence Detection**

The separation and quantitation of CPAHs was accomplished by using liquid chromatography with fluorescence detection in combination with water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a flow rate of 0.65  $\text{mL min}^{-1}$  as eluents. The column temperature was set at 32  $^{\circ}\text{C}$ . The gradient elution program used was 75% B during the first 10 min, ramp from 75% to 80% B over the next 7 and 80% B for another 4. Reconditioning the column took about 5 min. Using a column with a small inner diameter (3 mm) allowed a low flow rate to be employed and solvents saved without losing resolution. The fluorescence detection program was performed at the following excitation and emission wavelengths: Chry and BaA ( $\lambda_{\text{ex}}$  275 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  400 nm); BbF and BkF ( $\lambda_{\text{ex}}$  284 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  450 nm); BaP ( $\lambda_{\text{ex}}$  282 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  400 nm); DahAn and BghiP ( $\lambda_{\text{ex}}$  290 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm); and IP ( $\lambda_{\text{ex}}$  300 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  500 nm). Individual CPAHs were quantified by measuring the areas under the chromatographic peaks provided by 6  $\mu\text{L}$  aliquots of standard solutions of ACN:THF (50:50 v/v) containing analyte concentrations over the following ranges: 0.020–10  $\mu\text{g L}^{-1}$  for BkF and BaP; 0.025–10  $\mu\text{g L}^{-1}$  for BaA; 0.040–10  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Chry, BbF, DahA and BghiP; and 0.05–10  $\mu\text{g L}^{-1}$  for IP.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

---

### 3.1. Coating of MNPs with Alkyl Carboxylates

Sodium alkyl carboxylates react readily with magnetite at high temperatures to give surfactant monolayers chemisorbed onto the oxide surface.<sup>21,38</sup> The resulting tight hydrophobic sheath makes MNPs stable in nonpolar solvents, thereby facilitating the obtainment of ferrofluids for a variety of applications.<sup>13,20-22</sup> Most such applications rely on the preparation of 10–15 nm MNPs that are subsequently<sup>38-41</sup> or simultaneously<sup>42</sup> coated with either saturated straight-chain alkyl (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>) carboxylates or oleate at high temperatures. Once coated, the MNPs are washed with polar organic solvents to remove physisorbed surfactant. MNPs in particle sizes above 20 nm are rarely used since they are more difficult to disperse and hence less suitable for producing ferrofluids.

In this work, we examined the potential of magnetite coated with saturated straight-chain alkyl (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>) carboxylates as SPE materials. We chose to use commercially available magnetite in particle sizes of 20–30 nm for this purpose in order to facilitate preparation of the sorbent, and saturated straight-chain alkyl (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>) carboxylates on the grounds of their high ability to coat magnetite surfaces. In fact, the surface area occupied by these molecules on MNP particles about 10 nm in size is similar to that occupied by fatty acids as monomolecular films on water (20–22 Å<sup>2</sup> per molecule) irrespective of chain length.<sup>40</sup> An area of 20–22 Å<sup>2</sup> represents the compressive limit for a condensed film, which is reached when molecules become tightly packed together.<sup>43</sup> Oleate coatings are more readily expanded (36–38 Å<sup>2</sup> per molecule)<sup>40,41,44</sup> and hence less useful than octadecanoate coatings for the intended purpose, which led us to exclude the former from the study.

Because the packing density of alkyl carboxylates depends on several variables including the size of magnetite particles,<sup>20</sup> we examined their variation with the length of the alkyl chain, amount of surfactant and reaction

time on magnetite particles 20–30 nm in size (magnetite surface area  $\sim 60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).

Figure 1A shows the chemisorption isotherm for a monolayer of tetradecanoate on magnetite. The amount of surfactant added to the mineral oxide ranged from 0.05 to 2.5  $\text{mmol g}^{-1}$ . The other alkyl carboxylates studied (*viz.* decanoate, hexadecanoate and octadecanoate) behaved similarly in this respect. Chemisorption of the alkyl carboxylate onto magnetite increased in a virtually linear manner with surfactant coating concentrations below 1  $\text{mmol g}^{-1}$  and approached saturation at higher levels. The maximum surfactant coverage was ca. 0.35  $\text{mmol g}^{-1}$  irrespective of chain length (Y-axis in Figure 1A). An amount of alkyl carboxylate of 1  $\text{mmol g}^{-1}$  was thus selected as optimal to prepare the sorbents. The concentration of surfactant in the equilibrium solution increased up to around 17 mM in the interval tested (X-axis in Figure 1A). The surface area occupied by each surfactant molecule on the isotherm plateau was  $\sim 28 \text{ \AA}^2$ ; therefore, the packing density was ca. 25% lower than that for smaller NMP sizes (e.g. 20–22  $\text{\AA}^2$  for 7 nm particles).<sup>39,40</sup> These results agree with those recently obtained in the chemisorption of oleate on magnetic particles of variable size.<sup>20</sup> The surfactant coverage of saturated straight-chain alkyl carboxylates on 20–30 nm magnetite particles (28  $\text{\AA}^2$  per molecule) was higher than that of oleate on 7–10 nm particles (36–38  $\text{\AA}^2$  per molecule); this confirms that saturated straight-chain alkyl carboxylates coat MNP surfaces more tightly than does oleate. The time needed for surfactant coverage to peak was around 30 min at 85 °C irrespective of the particular alkyl carboxylate. By way of example, Fig. 1B shows the variation of the chemisorption rate of tetradecanoate on magnetite.

The above-described optimum conditions lead to magnetite being coated with both chemisorbed ( $\sim 75\%$ ) and physisorbed ( $\sim 25\%$ ) surfactant. Removal of the latter was attempted with various solvents including methanol, ethanol and distilled water. Washing with distilled water (5 mL  $\times$  3) sufficed to remove more than 99% of physisorbed decanoate. However, water failed to efficiently remove physisorbed surfactants of longer alkyl



chains, even when used at 50 °C or alkalized to pH 9. Complete removal (> 99%) of physisorbed tetradecanoate required washing the MNPs with three 4 mL aliquots of ethanol or methanol, the volume needed increasing slightly with increasing chain length (e.g. around 15 mL of ethanol was needed for hexadecanoic acid sodium salt).

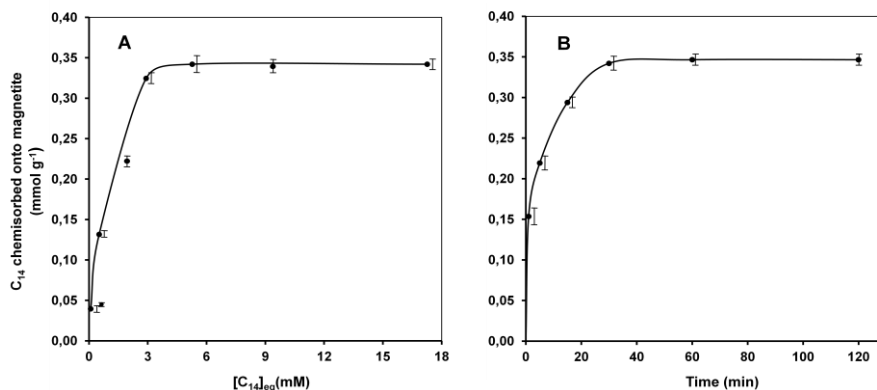


Figure 1. A) Isotherm for the chemisorption of tetradecanoate (0.05–2.5 mmol) onto 1 g of magnetite. (B) Amount of tetradecanoate chemisorbed as a function of time (tetradecanoate added = 1 mmol g<sup>-1</sup>). All measurements were made in triplicate

### ***3.2. Optimization of the Extraction of CPAHs with Alkylcarboxylate-Coated MNPs***

This was accomplished by conducting triplicate tests that involved extracting spiked distilled water with coated MNPs under a variety of experimental conditions (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub> alkylcarboxylates, 30–400 mg of sorbent, 0.15–175 ng of each CPAH, 100–500 mL of sample, pH 2–9, 0.1–1 M NaCl and 1–120 min stirring). The optimum conditions were established in terms of recoveries of the target compounds.

### 3.2.1. Selection of the Sorbent

Four different sorbents (*viz.*: MNPs coated with decanoate, tetradecanoate, hexadecanoate and octadecanoate) were tested for the extraction of CPAHs. Parallel tests with bare magnetite were also performed in order to determine the actual extraction efficiency of the surfactant layer. As can be seen from Table 2, recoveries exceeding the threshold value recommended by various international bodies for the extraction of contaminants,<sup>45,46</sup> 70%, were only obtained with alkyl chains of more than 14 carbon atoms; also, no significant improvement was obtained from C<sub>14</sub> to C<sub>18</sub>—not even with amounts of sorbent of up to 100 mg (results not shown).

The significant increase in recoveries from C<sub>10</sub> to C<sub>14</sub> relative to that from C<sub>14</sub> to C<sub>18</sub> could be a result of the suggested structure for the chemisorbed surfactant monolayer, which makes MNPs stable in ferrofluids. The formation of the monolayer has been interpreted in the light of the electric double layer model and carboxylate anions are assumed to be chemisorbed on the inner Helmholtz plane.<sup>47</sup> It has been suggested that the four methylene groups adjacent to the carboxylate ion are submerged within the double layer and not exposed to the aqueous medium (*i.e.* C<sub>10</sub> must behave as a C<sub>6</sub> chain in terms of water solubility and steric stabilization of MNPs<sup>46</sup>). Surely, the length of this chain length is too small to accommodate CPAHs and/or provide enough Van der Waals interactions, which would account for the poorer recoveries obtained. Based on the foregoing, we selected tetradecanoate-coated MNPs as sorbents to extract the target compounds.

**Table 2. Recoveries (%) ± standard deviations<sup>a</sup> obtained in the extraction of CPAHs with bare and alkyl carboxylate-coated magnetite**

	Bare magnetite	C10-coated	C14-coated	C16-coated	C18-coated
<b>BaA</b>	8±2	28±1	85±2	88±5	86±2
<b>Chrys</b>	13±5	30±3	85±5	89±1	85±4
<b>BbF</b>	19±3	54±1	90±4	93±2	90±1
<b>BkF</b>	19±4	51±1	90±3	93±2	93±3
<b>BaP</b>	22±4	43±1	89±2	93±4	92±2
<b>DahAn</b>	32±4	55±4	85±1	92±3	90±2
<b>BghiP</b>	36±5	60±5	84±2	92±2	90±3
<b>IP</b>	33±6	54±1	82±3	89±5	88±3

<sup>a</sup> n = 3; Extraction conditions: 250 mg of sorbent, 300 mL of distilled water spiked with 6 ng of CPAHs

### 3.2.2. Effect of Experimental Variables on Recoveries

Recoveries were found not to be affected by the sample volume when an amount of 100–500 mL of distilled water containing 7 ng of each CPAH was subjected to C<sub>14</sub>-MNP extraction with 200 mg of sorbent. A volume of 350 mL was thus adopted for further testing as it afforded sufficient concentration factors (~90–100) to meet LOQ requirements (~0.5 ng L<sup>-1</sup>). The influence of the amount of sorbent (30–400 mg) is illustrated in Table 3. As can be seen, recoveries were quantitative at 200 mg, which was thus chosen as optimal.

Recoveries exhibited no change with the amount of CPAH or NaCl over the ranges 0.15–175 ng and 0–1 M, respectively. Bare magnetite nanoparticles are known to be oxidized and easily lose their magnetism below pH 4. We examined the influence of this variable over the range 2–9 and found CPAH recoveries to remain constant from pH 2.5 to 9; this suggests that the carboxylate shield effectively protects nanoparticles over

this range. The protective action, however, was inefficient at lower pH values (*e.g.* CPAH recoveries were only around 55–65% at pH 2).

No leaching of tetradecanoate from the MNPs was observed under the recommended extraction conditions (see Experimental), as checked by chromatographic analysis of the extracts. Obtaining clean extracts obviously facilitates the accurate quantitation of the target analytes. This supports the use of hemimicelles in liquid chromatography, especially in combination with mass spectrometric detection. Extracts containing high surfactant concentrations have precluded the development of a number of MS applications by effect of their adverse effects on analyte ionization and/or detection.

**Table 3. Recoveries (%)  $\pm$  standard deviations<sup>a</sup> obtained in the extraction of CPAHs with variable amounts of C<sub>14</sub>-coated MNPs (mg)**

	30	60	100	200	300	400
<b>BaA</b>	26 $\pm$ 3	61 $\pm$ 1	75 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2	96 $\pm$ 6	96 $\pm$ 4
<b>Chrys</b>	24 $\pm$ 2	54 $\pm$ 3	79 $\pm$ 1	89 $\pm$ 5	94 $\pm$ 5	95 $\pm$ 2
<b>BbF</b>	35 $\pm$ 6	65 $\pm$ 1	80 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4	95 $\pm$ 2	96 $\pm$ 4
<b>BkF</b>	39 $\pm$ 5	67 $\pm$ 5	82 $\pm$ 2	92 $\pm$ 3	98 $\pm$ 1	100 $\pm$ 3
<b>BaP</b>	37 $\pm$ 2	63 $\pm$ 4	81 $\pm$ 2	91 $\pm$ 2	101 $\pm$ 3	102 $\pm$ 1
<b>DahAn</b>	41 $\pm$ 5	65 $\pm$ 4	83 $\pm$ 3	89 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
<b>BghiP</b>	40 $\pm$ 4	64 $\pm$ 5	82 $\pm$ 4	87 $\pm$ 2	95 $\pm$ 3	100 $\pm$ 1
<b>IP</b>	39 $\pm$ 4	66 $\pm$ 3	77 $\pm$ 2	88 $\pm$ 3	95 $\pm$ 3	98 $\pm$ 1

<sup>a</sup> *n* = 3; Extraction conditions: 350 mL of distilled water spiked with 7 ng of CPAHs

The reusability of the sorbent after elution of CPAHs was assessed in various water matrices. The recoveries of the target compounds from river and reservoir water samples were found to remain constant after reusing the sorbent 5 times without further treatment. After that, recoveries progressively decreased (*e.g.* 20-25% after 7 extractions) probably due to the progressive accumulation of matrix components. Treatments for cleaning the

sorbents after five uses (e.g. two washing steps with 5 mL each of acetonitrile, methanol or water) were not successful in removing strongly adsorbed matrix components. On the other hand, seawater extraction produced non-reusable sorbents, -not even if the sorbent was washed with distilled water to remove excess salt. Sorbents behaved similarly in distilled water solutions containing salt (i.e. NaCl) at seawater concentrations, but although salt was identified as the agent causing non-reusability, no explanation for this behaviour was found.

### ***3.2.3. Selection of the Desorption Solution***

The desorption of CPAHs from MNPs was studied with MeOH, ACN and THF, using various elution programs that involved solvent volumes from 0.5 to 5 mL and 1–5 runs; both variables were found to directly influence recoveries. Using a 500 mL cone instead of a 500 mL beaker permitted the use of low solvent volumes and facilitated retention of MNPs on a small magnet. Complete removal of water in the vessel and adsorbed onto the MNPs was required to avoid a decrease in solvent desorption efficiency and changes in the final volume. Water was displaced from MNPs by passing a nitrogen stream at ~1 bar for ~2 min while they were retained on the magnet.

Recoveries above 90% were obtained for all CPAHs by using 3 mL of THF in two steps (1+2 mL). Similar results were obtained with ACN (1+2 mL) for the less hydrophobic CPAHs (*viz.* BaA, Chrys, BbF, BkF and BaP); this solvent, however, provided poorer recoveries for the most hydrophobic compounds, DahAn ( $82\pm 3\%$ ), BghiP ( $69\pm 3\%$ ) and IP ( $74\pm 3\%$ ). On the other hand, methanol (1+2 mL) was rather inefficient, with CPAH recoveries from 24 to 50% only.

Injection of a 6  $\mu$ L aliquot of the THF extract into the chromatographic system and use of a mobile phase consisting of 75:25 (v/v) ACN:Water reduced analyte peak resolution owing to the lower polarity of the former. We found a 50:50 (v/v) mixture of ACN and THF to have the same elution capacity as THF and to result in no degradation in peak resolution, which led

us to adopt this solvent mixture for elution of the CPAHs. Manual agitation for about 30 s, followed by standing for 1 min, sufficed to ensure complete desorption. Under these conditions, the magnetite coating retained its integrity and the sorbent was reusable.

We assessed the possibility to concentrate the 3 mL of eluate to 1 mL by evaporation under a gentle stream of nitrogen. No losses were found to result from this drying operation thanks to the low volatility of PAHs with 4–6 rings. This allowed the sensitivity to be increased threefold. However, the LOQs obtained without drying, 0.2–0.5 ng L<sup>-1</sup>, are low enough to meet the quality criteria of current legislation, so we propose dispensing with the evaporation step in order to make the procedure simpler and faster for routine analyses.

#### **3.2.4. Influence of the CPAH Preservation Conditions on Recovery**

Polycyclic aromatic hydrocarbons are strongly adsorbed onto container surfaces, which causes substantial losses during storage of samples<sup>48</sup> (*e.g.* losses as high as 15%<sup>49</sup> have been reported for BaP after storage in glass containers for 24 h). Two commonly used strategies for preserving PAH-containing water are the addition of an organic solvent (*e.g.* acetonitrile, isopropanol or methanol in proportions between 10 and 20% v/v)<sup>50-52</sup> or a surfactant [*e.g.* sodium dodecyl sulfate (SDS),<sup>48</sup> Brij 35<sup>53</sup>] in amounts exceeding its critical micelle concentration (cmc). The former usually results in poor extraction recoveries and the latter can interfere with chromatographic or detection systems.

We initially assessed the ability of methanol (5–30%) and tetrabutylammonium bromide (1–500 mg L<sup>-1</sup>), a well-known hydrotrope, to keep CPAHs in solution. Tests were carried out on spiked river samples that were previously filtered and adjusted to pH 4.5 with concentrated nitric acid. The samples were simultaneously supplied with stabilizing agents and CPAHs prior to storage at 4 °C in the dark until direct analysis by LC/FL on a daily basis for a week. All tests were performed in triplicate. The addition of

20% of methanol or a 50 mg L<sup>-1</sup> concentration of TBA prevented the loss of CPAHs (maximum analyte concentration tested 600 ng L<sup>-1</sup>) for at least 5 days. This concentration of TBA ( $0.15 \times 10^{-3}$  M) is well below its cmc ( $\sim 75 \times 10^{-3}$  M); therefore, the enhanced water solubility of the CPAHs must have arisen mainly from the establishment of hydrophobic and  $\pi$ -cation interactions with the monomer rather than with aggregates. The use of TBA above the cmc did not prevent the adsorption of CPAHs for a longer period.

The extraction efficiency for C<sub>14</sub>-MNPs in the presence of these additives at the previous concentrations was assessed. Recoveries were found not to be affected by the presence of the hydrotrope TBA; on the other hand, those for most of the studied CPAHs were significantly decreased by the presence of 20% of methanol (*e.g.* to  $50 \pm 4$ ,  $52 \pm 4$ ,  $73 \pm 3$ ,  $79 \pm 2$  and  $77 \pm 4$  for BaA, Chrys, BbF, BkF and BaP, respectively). The decrease was exclusively due to enhanced partitioning of CPAHs to the aqueous sample since the carboxylate shield was not affected; as a result, recoveries remained constant in successive reuses. This led us to preserve CPAHs by adding a 50 mg L<sup>-1</sup> concentration of TBA to the samples.

### **3.3. Analytical Performance**

Table 4 lists the analytical figures of merit of the proposed method. The instrumental limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) were calculated from blank determinations at a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. Such limits were used to estimate the LODs and LOQs for the proposed method with provision for the actual concentration factors obtained ( $\sim 100$ ). The method LOQs for the individual CPAHs ranged from 0.2 to 0.5 ng L<sup>-1</sup> (see Table 4). Consequently, the proposed method affords their quantification at concentrations below the ultra-trace levels established by EPA (3.8 ng L<sup>-1</sup>) and those set by EU for surface waters (2–50 ng L<sup>-1</sup>). Under the proposed experimental conditions, CPAHs recoveries ranged from 88% to 93% throughout the studied concentrations range ( $\sim 1$ –500 ng L<sup>-1</sup>), and standard deviations from 1 to 8%.

**Table 4. Analytical performance of the proposed method**

Target compound	<sup>a</sup> Capacity factor	External calibration			LOQ <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	LOD <sup>d</sup> (ng L <sup>-1</sup> )
		Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Slope $\pm$ SD [( $\times 10^3$ ) mV L $\mu\text{g}^{-1}$ ]	<sup>b</sup> $r$		
BaA	5.4	0.025–10	183.1 $\pm$ 5.3	0.998	0.25	0.15
Chry	6.1	0.04–10	50.2 $\pm$ 2.3	0.998	0.4	0.25
BbF	9.4	0.04–10	84.5 $\pm$ 4.0	0.998	0.4	0.25
BkF	11.4	0.020–10	228 $\pm$ 8.2	0.998	0.2	0.1
BaP	13.9	0.020–10	143 $\pm$ 7.2	0.998	0.2	0.1
DahA	18.9	0.04–10	132 $\pm$ 3.9	0.998	0.4	0.25
BghiP	21.2	0.04–10	126 $\pm$ 3.4	0.997	0.4	0.25
IP	23.5	0.05–10	48.3 $\pm$ 1.8	0.997	0.5	0.25

<sup>a</sup> column void marker: acetone ; <sup>b</sup> correlation coefficient;  $n = 7$ ; <sup>c</sup> estimated limits of quantitation of the method; <sup>d</sup> estimated limits of detection of the method

The potential interference of matrix components co-eluting with CPAHs was assessed by comparing the slopes of the calibration curves ( $n = 7$ ) obtained from standards with those provided by blank eluates of sea water ( $n = 2$ ) and fresh water ( $n = 2$ ) spiked with known amounts of CPAHs. The difference between such slopes and those obtained for environmental samples were found to be statistically insignificant in terms of Student's  $t$ .<sup>54</sup> In fact, the calculated  $t$ -values fell in the range 0.2–0.7 and were below the critical value (3.17), the significance being set at the 0.01 levels. Therefore, matrix components are expected not to interfere with the determination of the target compounds.

The precision of the method was evaluated by extracting 11 different spiked samples of fresh ( $n = 7$ ) and sea water ( $n = 4$ ). The results for the eight CPAHs, expressed as relative standard deviation (RSD), ranged from 3% to 6%.



**Table 5. Mean concentration (ng L<sup>-1</sup>) ± standard deviation (n = 3) of the CPAHs found in surface water samples, and percent recoveries ± standard deviations (n = 3) obtained upon spiking with the target analytes**

Sample origin	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	IP
Well <sup>a</sup>	n.d. 92±6	n.d. 91±4	n.d. 91±5	n.d. 94±4	n.d. 89±2	n.d. 87±3	n.d. 87±3	n.d. 87±4
River Guadalquivir (site 1) <sup>c</sup>	n.d. 87±1	n.d. 89±1	n.d. 88±6	n.d. 91±3	n.d. 91±4	n.d. 87±3	n.d. 87±2	n.d. 88±3
River Guadalquivir (site 2) <sup>d</sup>	n.d. 88±6	n.d. 87±5	n.d. 90±1	n.d. 90±3	n.d. 90±6	n.d. 86±2	n.d. 85±3	n.d. 85±5
River Rabanales <sup>b</sup>	n.d. 88±5	n.d. 87±4	n.d. 90±6	n.d. 90±4	n.d. 92±5	n.d. 88±5	n.d. 87±2	n.d. 86±4
Navallana reservoir <sup>a</sup>	n.d. 92±1	n.d. 93±2	n.d. 91±1	0.51 ±0.03 93±3	0.42 ±0.01 88±1	0.75 ±0.03 90±1	<LOQ 88±5	0.96 ±0.05 89±5
Malagueta beach <sup>b</sup>	n.d. 88±3	n.d. 89±3	n.d. 90±5	n.d. 94±5	n.d. 91±6	n.d. 89±5	n.d. 86±2	n.d. 85±4
Alamos beach <sup>c</sup>	n.d. 92±2	n.d. 90±6	n.d. 91±2	n.d. 90±2	n.d. 89±4	n.d. 90±1	n.d. 86±5	n.d. 86±5

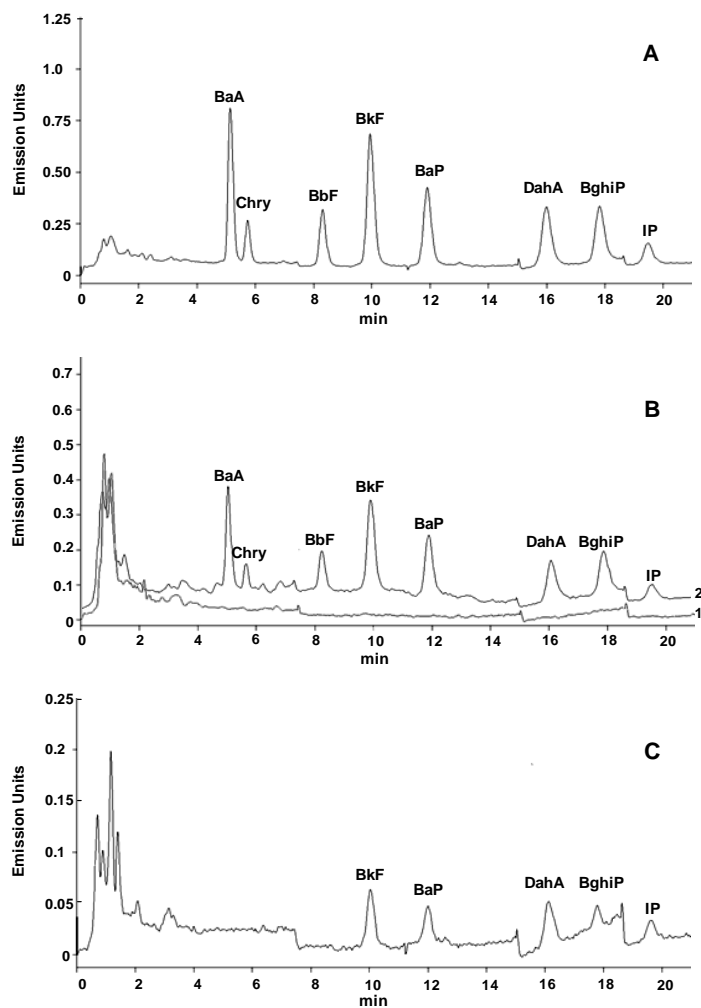
Spiking level: <sup>a</sup> 1 ng L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> 5 ng L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> 2 ng L<sup>-1</sup>; <sup>d</sup> 10 ng L<sup>-1</sup>; n.d. = not detected; < LOQ = detected, but below the limit of quantitation

### 3.4. Analysis of Environmental Water Samples

The suitability of the proposed method for use with real-world samples was established by applying it to the determination of CPAHs in samples from two rivers ( $n = 3$ ), a reservoir, two beaches and a well. Table 5 shows the results, expressed as the mean value of three independent determinations, in addition to their corresponding standard deviations before and after spiking with variable concentrations of CPAHs over the range 1–10 ng L<sup>-1</sup>. As can be seen, recoveries ranged from 85% to 94% and relative standard deviations from 1 to 6%.

The target compounds were only present in one of the studied samples, namely: water from Navallana reservoir, which contained BkF, BaP, DahA,

BghiP and IP, all at very low concentrations (0.42–0.96 ng L<sup>-1</sup>), however. These values are below the EPA and EU limits. Figure 2 shows the chromatograms for a standard solution in 50:50 (v/v) ACN:THF (A), water from Los Alamos beach before and after spiking (B) and water Navallana reservoir (C). As can be seen, no interference from matrix components was detected in any sample.



**Figure 2.** LC/fluorescence chromatograms for (A) a standard solution in 50:50 (v/v) acetonitrile:tetrahydrofuran (0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); (B) Los Alamos beach sample before (1) and after spiking at 2 ng L<sup>-1</sup> (2); and (C) Navallana reservoir sample

## 4. CONCLUSIONS

---

Alkylcarboxylate hemimicelles chemisorbed onto magnetic nanoparticles constitute a useful alternative to conventional ionic surfactant hemimicelles physisorbed onto oppositely charged mineral oxides for the extraction of hydrophobic compounds. Major general advantages are the obtainment of surfactant free extracts, pH-independent surfactant loads, extended working pH range and reusability to a certain extent.

Based on the results obtained in this work, these sorbents operate in an efficient manner under real-world conditions. Their use for the extraction of CPAHs (4-6 ring PAHs) has permitted the development of a simple, rapid, matrix-independent method for the routine determination of these carcinogenic compounds at the levels required by EU and US EPA in a variety of environmental water samples. The extraction procedure is robust; also, no cleanup of the extracts or solvent evaporation is needed, extractions take only 15 min (recoveries 85-94% with RSDs (1-6%), and the sorbent is compatible with the presence of stabilizing agents for preservation of the analytes during storage of samples. Compared to SBSE, which is the best suited microextraction technique for CPAHs,<sup>55</sup> the proposed method surpasses it in: a) extraction time (i.e. around 24 h are required to reach equilibrium conditions in SBSE<sup>55</sup> and selected extraction times range from 60 min<sup>55</sup> to 14 h.<sup>56</sup> Additionally, a slow desorption in at least two steps is required<sup>35</sup>); b) recoveries, which are low (e.g. 29-87%,<sup>55</sup> 60-85%,<sup>35</sup> 50-90%<sup>56</sup>) and matrix-dependent; and c) relative standard deviations (e.g. 14.2-21.6%<sup>55</sup>).

This work opens up new avenues for developing admicelle-based sorbents from alkylcarboxylates containing polymerizable bonds (*i.e.* bonds similar to those used in the formation of molecular micelles) and tunable sorbents with a variety of functionalities (*e.g.* from bolaamphiphiles such as dicarboxylic acids, alkylbetaine surfactants, polymers with carboxylic functional groups) useful for multiresidue determinations. Both hemimicelles and admicelles synthesized in this way provide surfactant-free extracts, which opens up interesting prospects for use in LC-MS, GC and CE in

combination with various detector types. Work currently under way in our laboratory may lead to further advances in this area in the near future.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge funding from Spain's MCyT (Project CTQ2008-01068) A. Ballesteros-Gómez is also grateful to Spain's MEC for award of a doctoral fellowship (AP2005-4275).

### REFERENCES

- [1] Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 2009, *81*, 4601-4622.
- [2] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 2003, *75*, 6799-6806.
- [3] Merino, F.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.* 2004, *76*, 3878-3886.
- [4] Cantero, M.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 2006, *1120*, 260-267.
- [5] Cantero, M.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 2005, *1067*, 161-170.
- [6] Saitoh, T.; Matsushima, S.; Hiraide, M. *J. Chromatogr. A* 2004, *1040*, 185-191.
- [7] Saitoh, T.; Nakayama, M.; Hiraide, M. *J. Chromatogr. A* 2002, *972*, 205-209.
- [8] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 2006, *569*, 132-138.
- [9] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 2005, *1100*, 8-14.
- [10] Costi, E.M.; Goryacheva, I.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *J. Chromatogr. A* 2008, *1210*, 1-7.
- [11] Zhao, X.; Li, J.; Shi, Y.; Cai, Y.; Mou, S.; Jiang, G. *J. Chromatogr. A* 2007, *1154*, 52-59.
- [12] Moral, A.; Sicilia, M.D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta* 2008, *608*, 61-72.

- [13] Shen, L.; Stachowiak, A. *Langmuir* 1999, 15, 447-453.
- [14] Li, Q.; Xuan, Y.M.; Wang, J.; *Exp. Therm. Fluid. Sci.* 2005, 30, 109-116.
- [15] Zhao, D.-L.; Wang, X.-X.; Zeng, X.-W.; Xia, Q.-S.; Tang, J.-T. *J. Alloys Compd.* 2009, 477, 739-743.
- [16] Zhu, L.; Ma, J.; Jia, N.; Zhao, Y.; Shen, H. *Colloids Surf., B* 2009, 68, 1-6.
- [17] Ma, H.L.; Xu, Y.F.; Qi, X. R.; Maitani, Y.; Nagai, T. *Int. J. Pharm.* 2008, 354, 217-226.
- [18] Roonasi, P.; Holmgren, A. *App. Surf. Sci.*, 2009, 255, 5891-5895.
- [19] Rocchiccioli-Deltcheff, C.; Frank, R.; Cabuil, V.; Massart, R. *J. Chem. Research (S)* 1987, 126-127
- [20] Zhang, L.; Ge, R.; Gu, H.-C. *App. Surf. Sci.* 2006, 253, 2611-2617
- [21] Avdeev, M.V.; Bica, D.; Vékás, L.; Marinica, O.; Balasoiu, M.; Aksenov, V.L.; Rosta, L.; Garamus, V. M.; Schreyer, A. J. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, 311, 6-9.
- [22] Avdeev, V.; Balasoiu, M.; Aksenov, V.L.; Garamus, V.M., Kohlbrecher, J.; Bica, D.; Veka, L. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, 270, 371-379.
- [23] Šafaříková, M.; Šafařík, I. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 194, 108-112.
- [24] Šafaříková, M.; Lunackova, P.; Komarek, K.; Hubka, T.; Šafařík, I. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007, 311, 405-408.
- [25] Sha, Y.; Deng, C.; Liu, B.; *J. Chromatogr. A* 2008, 1198-1199, 27-33.
- [26] Huang, C.; Hun, B. *Spectrochim. Acta, Part B* 2008, 63, 437-444.
- [27] Sabo, J.; Hu, S.B.; Peng, H.; Huang, C. *Talanta* 2009, 77, 1579-1583.
- [28] Li, J.; Zhao, X.; Shi, Y.; Cai, Y.; Mou, S.; Jiang, G. *J. Chromatogr. A* 2008, 1180, 24-31.
- [29] Zhao, X.; Shi, Y.; Wang, T.; Cai, Y.; Jiang, G. *J. Chromatogr. A* 2008, 1188, 140-147.

- [30] Sun, L.; Zhang, C.; Chen, L.; Liu, J.; Jin, H.; Xu, H.; Ding, L. *Anal. Chim. Acta* 2009, 638, 162-168.
- [31] United States Environmental Protection Agency (USEPA) 2002. National Recommended Water Quality Criteria: 2002. Office of Water, Office of Science and Technology. EPA-822-R-02-047. Available at: <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqcriteria.html>
- [32] 2006/0129 Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, European Commission, Brussels, 2006.
- [33] 2007/C97/02 Opinion of the European Economic and Social Committee on the Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, Off. J. Eur. Union C97 (2007) 3.
- [34] Buseti, F.; Heitz, A.; Cuomo, M.; Badoer, S.; Traverso, P. *J. Chromatogr. A* 2006, 1102, 104-115.
- [35] Pham, T. T.; Proulx, S.; *Wat. Res.* 1997, 31, 1887-1896.
- [36] Fernández-González, V.; Concha-Graña, E.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. *J. Chromatogr. A* 2007, 1176, 48-56.
- [37] Bourdat-Deschamps, M.; Daudin, J.J.; Barriuso, E. *J. Chromatogr. A* 2007, 1167, 143-153.
- [38] Wang, X.; Zhang, C.; Wang, X.; Gu, H. *Appl. Surf. Sci.*, 2007, 253, 7516-7521.
- [39] Shen, L.; Stachowiak, A. *Langmuir* 1999, 15, 447-453.
- [40] Wooding A.; Kilner, M.; Lambrick, D.B. *J. Colloid Interface Sci.* 1991, 144, 236-242.
- [41] Roonase, P.; Holmgren, A.; *App. Surf. Sci.* 2009, 255, 5891-5895.
- [42] Maity, D.; Agrawal, D.C.; *J. Magn. Magn. Mater.* 2007, 308, 46-55
- [43] Shaw, D.J., *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed.; Butterworths: London, 1980, p. 90.

- [44] Cases, J.M.; Poirier J.E. In *Solid-Liquid Interactions in Porous Media*; Canet, J.M., Ed.; Technip: Paris, 1985, pp. 335-370.
- [45] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemicals, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999.SANCO/3103/2000, Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, 2nd ed., 1999/2000.
- [46] Barceló, D. *Environmental Analysis, Techniques Applications Quality Assurance*. Elsevier:Amsterdam, 1993, p. 149.
- [47] Khalafalla, S.E.; Reimers, G.W. *IEEE Trans. Magn.* 1980, *MAG-16*, 178-183.
- [48] Wolska, L.; Rawa-Adkonis, M.; Namieśnik, J. *Anal Bioanal. Chem.* 2005, *382*, 1389–1397.
- [49] Sicilia, D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D.; Maniasso, N.; Zagatto, E.A.G.; *Anal. Chim. Acta* 1999, *392*, 29-38.
- [50] Gimeno, R.A.; Altelaar, A.F.M.; Marcé, R.M.; Borrull, F. *J. Chromatogr. A* 2002, *958*, 141-148.
- [51] El Harrak, R.; Callull, M.; Marcé, R.M.; Borrull, F. *J. High Resol. Chromatogr.* 1998, *21*, 667-670.
- [52] Kolahgar, B.; Hoffmann, A.; Heiden, A.C. *J. Chromatogr. A* 2002, *963*, 225-230.
- [53] Brouwer, E.R.; Hermans, A.N.J.; Lingernan, H.; Brinkman, U.A.Th. *J. Chromatogr. A* 1994, *669*, 45-57.
- [54] Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campaña, A.M.; Alés-Barrero, F.; Jiménez-Linares, C.; Román-Ceba, M. *J. AOAC Int.* 1995, *78*, 471-476.
- [55] Popp, P.; Bauer, C.; Hauser, B.; Keil, P.; Wennrich, L. *J. Sep. Sci.* 2003, *26*, 961-967.
- [56] Pérez-Carrera, E.; León-León, V.M.; Gómez-Parra, A.; González-Mazo, E. *J. Chromatogr. A* 2007, *1170*, 82-90.

# RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS







## **1. OBJETIVOS GENERALES**

---

En las investigaciones que se incluyen en esta Memoria se ha abordado el estudio y aplicabilidad de disolventes y adsorbentes supramoleculares para el desarrollo de métodos rápidos de extracción y determinación de contaminantes prioritarios y emergentes. Paralelamente, se han llevado a cabo investigaciones para caracterizar la composición, microestructura, propiedades y/o comportamiento de los sistemas supramoleculares utilizados. Asimismo, se han propuesto nuevos sistemas supramoleculares con propiedades no descritas hasta la fecha y aplicables en procesos de extracción: disolventes supramoleculares con agregados de tamaño y composición definida y programable, y adsorbentes constituidos por hemimicelas irreversibles con propiedades magnéticas.

Esta sección ofrece una visión general de los principales resultados obtenidos en las investigaciones desarrolladas. Se discuten en primer lugar los aspectos relacionados con los tipos de muestras y los analitos determinados, las variables experimentales estudiadas, las características analíticas de los métodos propuestos y la aplicabilidad de los mismos al análisis de muestras reales. Por otro lado se presentan los principales resultados teóricos obtenidos respecto a las características de los sistemas supramoleculares estudiados y su repercusión en cuanto a su uso como extractantes.

La etapa de tratamiento de la muestra es la más crítica del proceso analítico. Debido a la variabilidad y complejidad de las muestras y los niveles de concentración tan bajos a los que se encuentran los analitos, esta etapa implica múltiples operaciones (normalmente no automatizadas) tales como extracción, limpieza, evaporación-reconstitución o derivatización. El tratamiento de muestra es por tanto la etapa determinante en cuanto a consumo de tiempo y de reactivos y es la principal fuente de errores. Su simplificación constituye, por tanto, una prioridad en el diseño de nuevos métodos analíticos.

Las estrategias seguidas en esta Tesis para la simplificación de la etapa de tratamiento de la muestra se basan en el uso de sistemas supramoleculares constituidos por agregados moleculares de tensioactivo. Estos sistemas ofrecen diferentes tipos de interacciones para la extracción de los analitos y tienen capacidad multiligando gracias a los múltiples sitios de unión que contienen. Gracias a estas propiedades y a la gran concentración de tensioactivo existente en los agregados, proporcionan elevados rendimientos de extracción.

Además, los agregados moleculares presentan ciertas características relevantes desde el punto de vista operacional: se generan mediante fenómenos de autoensamblaje al alcance de cualquier laboratorio; están constituidos por moléculas anfifílicas que son ubicuas en la naturaleza y en las síntesis química; suelen ser biodegradables y de bajo coste; presentan baja volatilidad e inflamabilidad; son compatibles con los sistemas de separación y detección usados en los procesos analíticos; y estabilizan los compuestos solubilizados, permitiendo integrar la recogida de muestra, transporte, conservación, extracción y concentración de contaminantes en el medio ambiente.

## **2. TIPOS DE MUESTRAS Y ANALITOS ESTUDIADOS**

---

Los compuestos orgánicos seleccionados para su estudio en las investigaciones que se recogen en esta Tesis se consideran prioritarios o emergentes según la legislación europea vigente. Concretamente se estudió un grupo de PAHs y clorofenoles cancerígenos según la *International Agency for Research of Cancer (IARC)*, bisfenoles A y B y sus éteres diglicídicos, la micotoxina ocratoxina A y una variedad de compuestos perfluorados.

Las muestras analizadas incluyeron una variedad de muestras líquidas ambientales, en concreto aguas superficiales (aguas de río, arroyo, pozo, pantano y agua de mar) y aguas residuales (influentes y efluentes de plantas depuradoras), todas ellas recogidas en las provincias de Córdoba, Jaén,

Málaga o Cádiz. Con respecto a las muestras de alimentos, se analizaron una amplia variedad de alimentos líquidos (vino y productos derivados, infusiones de té y café y refrescos), adquiridas en supermercados de Córdoba, y alimentos sólidos (pescados, carnes, frutas, verduras y queso) y aceite de girasol adquiridos en supermercados de Amsterdam. La variedad de matrices y analitos implicados pone de manifiesto la versatilidad y amplia aplicabilidad de las metodologías propuestas.

En la tabla 2.a. se muestran los analitos estudiados en las investigaciones que se recogen en esta Memoria, las matrices donde se han determinado, su toxicidad y origen y la legislación europea vigente aplicable en cada caso.

**Tabla 2.a. Contaminantes prioritarios y emergentes investigados**

CONTAMINANTES	MATRIZ	ORIGEN	TOXICIDAD	LEGISLACIÓN
<b>PAHs</b> Benzo [a] antraceno (BaA) Criseno (Cris) Benzo [a] pireno (BaP) Benzo[b]fluoranteno (BbF) Benzo[k]fluoranteno (BkF) Benzo [g,h]perileno (BghiP) Dibenzol[a,h]antraceno (DahAn) Indeno [1,2,3-c-d]pireno (IP)	Aguas naturales, aguas residuales y bebidas de té y café	Combustión incompleta de la materia orgánica de origen natural (emisiones volcánicas, incendios...) o antropogénico (uso de combustibles fósiles, secado o tostado durante el procesamiento de alimentos)	Cancerígenos según IARC	Aguas naturales: (normas de calidad del agua): BaP 50 ng/L; suma de BbF, y BkF, 30 ng/L; suma de IP y BghiP, 2 ng/L (DIRECTIVA 2008/105/EC)  Aguas naturales ( <i>water quality criteria</i> , EPA: 3.8 ng/L para Cris, BaA, BaP, BbF, BkF, DahA e IP (National Recommended Water Quality Criteria: 2002, EPA-822-R-02-047)  Alimentos: 1-10 mg/kg para BaP (REGLAMENTO (CE) No 1881/2006)
<b>BISFENOLES</b> Bisfenol A (BPA) y F (BPF), éteres diglicídicos de bisfenoles A (BADGE) y F (BFDGE)	Aguas naturales, aguas residuales y refrescos	Migración desde el envase (policarbonatos y resinas epoxi)	Alteradores endocrinos	Aguas naturales: sujeto a revisión para inclusión en lista de contaminantes prioritarios (ANEXO III DIRECTIVA 2008/105/EC).  Alimentos: Límite de migración 600 mg Kg <sup>-1</sup> DIRECTIVA 2004/19/EC

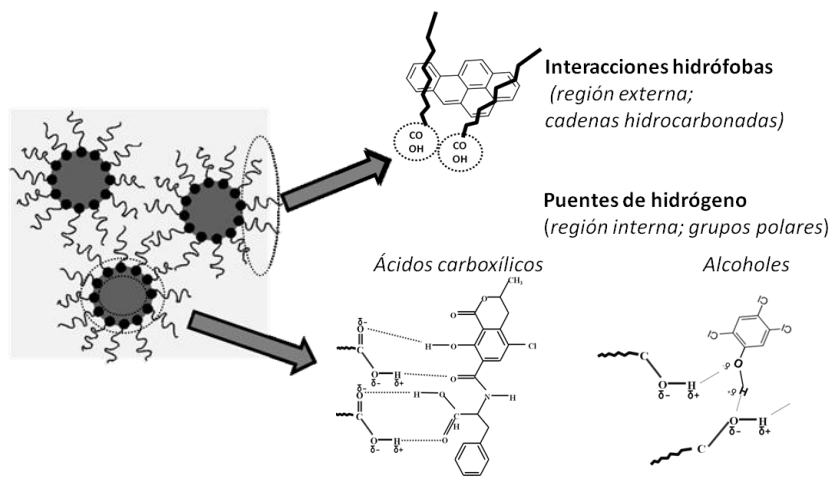
Tabla 2.a. Contaminantes prioritarios y emergentes investigados

CONTAMINANTES		MATRIZ	ORIGEN	TOXICIDAD	LEGISLACIÓN
<b>MICOTOXINAS</b>	Ocratoxina A (OTA)	Vino, vinagre, mosto y cerveza	Toxina producida por los hongos <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	Cancerígeno (IARC), agente nefrotóxico	Vino, mosto y vinagre: 2 µg Kg <sup>-1</sup> para OTA (REGLAMENTO (CE) No 1881/2006)
<b>COMPUESTOS PERFLUORADOS</b>	Ácidos perfluoroalquilados (C <sub>4</sub> -C <sub>14</sub> ) Sulfonatos perfluoroalquilados (C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub> )	Carne, pescado, verduras, frutas, aceite de girasol, queso.	Materiales en contacto con alimentos durante envasado, procesado o cocinado (ejemplo teflón)	Alteradores endocrinos, agentes neurotóxicos y nefrotóxicos	Aguas naturales: perfluorooctanosulfonato (PFOS) sujeto a revisión para inclusión en lista de contaminantes prioritarios (ANEXO III DIRECTIVA 2008/105/EC). Alimentos: Recomendación 2010/161/UE
<b>CLOROFENOLES</b>	2,4-Diclorofenol (2,4-D) 2,4,5-Triclorofenol (2,4,5-TCP) 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCP) 2,3,4,6-Tetraclorofenol (2,3,4,6-TTCP) Pentaclorofenol (PCP)	Agua de río, pantano y mar		Cancerígeno (IARC)	Aguas naturales: (normas de calidad del agua): PCP 0.4-1 µg/L (DIRECTIVA 2008/105/EC)

### 3. SISTEMAS DE EXTRACCIÓN PROPUESTOS

#### 3.1. Sistemas supramoleculares

En las investigaciones desarrolladas en esta Tesis se han utilizado como extractantes dos tipos de sistemas supramoleculares: a) disolventes supramoleculares (SUPRASs) de micelas inversas de ácidos carboxílicos ( $C_8$ - $C_{14}$ ) o alcoholes alifáticos ( $C_7$ - $C_{14}$ ) en mezclas de tetrahidrofurano (THF):agua y b) hemimicelas de alquilcarboxilatos ( $C_{10}$ - $C_{18}$ ) quimiadsorbidas sobre nanopartículas de magnetita. Las principales fuerzas responsables de la extracción de los solutos en los disolventes supramoleculares empleados han sido de dispersión (en la región hidrocarbonada de los anfífilos) y puentes de hidrógeno (en las cabezas polares del tensioactivo) (ver Figura 3.1).

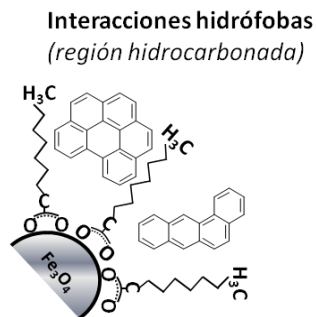


**Figura 3.1.a Principales fuerzas intermoleculares conductoras de la extracción de contaminantes en SUPRASs de micelas inversas.**

En el caso de las hemimicelas de alquilcarboxilatos sobre nanopartículas magnéticas, la capa única de tensioactivo se encuentra con los grupos carboxilato coordinados al hierro. Como consecuencia, el grupo polar no está

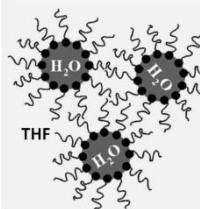
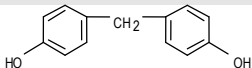
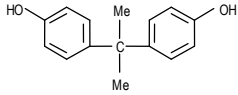
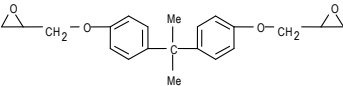
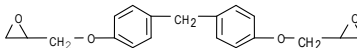
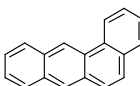
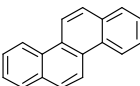
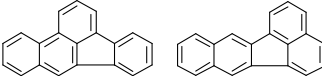
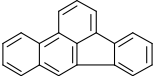
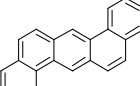
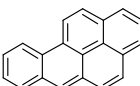
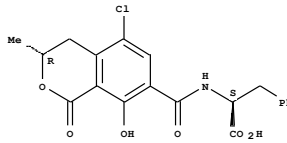
disponible para interactuar con los analitos a extraer y las fuerzas directoras serían únicamente hidrófobas (ver Figura 3.1.b).

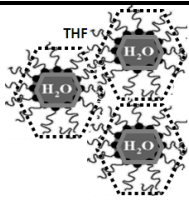
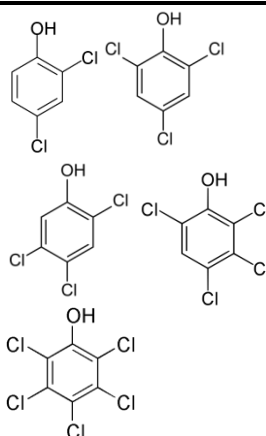
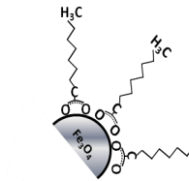
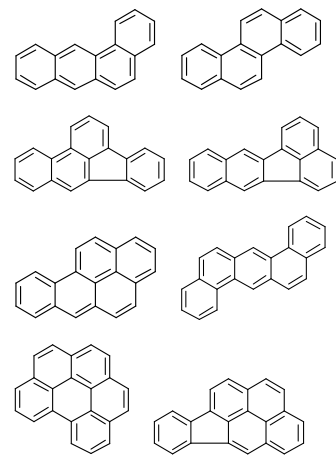
En la Tabla 1.1.a se muestran los sistemas supramoleculares usados en las aplicaciones propuestas en esta Tesis; los contaminantes a los que se han aplicado y los factores de concentración obtenidos en los métodos propuestos. En cuanto a los analitos, se indican sus características de hidrofobicidad expresado como el logaritmo de la constante octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) y la suma de grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, al ser estas las dos variables consideradas como fuerzas conductoras de la extracción.



**Figura 3.1.b Principales fuerzas intermoleculares directoras de la extracción de contaminantes en hemimicelas de alquilcarboxilatos sobre nanopartículas de magnetita**



SISTEMA SUPRAMOLECULAR	ANALITOS (log K <sub>ow</sub> /suma de grupos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno) <sup>b</sup>	FC <sup>a</sup>
 <p data-bbox="211 820 379 953">Micelas inversas de ácido decanoico en THF:agua</p>	<b>BISFENOLES Y ÉTERES DIGLICIDÍlicos: INTERACCIONES HIDRÓFOBAS Y PUENTES DE HIDRÓGENO</b>	
	 <p data-bbox="841 563 953 592">BPA (3.3/4)</p>	90
	 <p data-bbox="841 639 946 668">BPF (2.9/4)</p>	87
	 <p data-bbox="841 715 974 744">BADGE (3.9/4)</p>	108
	 <p data-bbox="841 811 967 839">BFDGE (3.3/4)</p>	99
	<b>PAHS: INTERACCIONES HIDRÓFOBAS</b>	
	 <p data-bbox="827 963 918 991">BaA (5.9)</p>	282
	 <p data-bbox="827 1020 911 1049">Cris (5.9)</p>	288
	 <p data-bbox="827 1077 953 1106">BbF, BkF (6.4)</p>	288
	 <p data-bbox="827 1153 925 1182">BaP (6.4) y</p>	285
	 <p data-bbox="827 1172 967 1201">DahAn (7.1)</p>	285
	 <p data-bbox="827 1268 883 1296">IP (6.9)</p>	285
	<b>OCRATOXINA A: INTERACCIONES HIDRÓFOBAS Y PUENTES DE HIDRÓGENO</b>	
	 <p data-bbox="841 1477 960 1506">OTA (4.6/10)</p>	141

		<p>2,4-DCP (2.9/2), 215, 2,4,6-TCP (3.6/2) 225</p> <p>2,4,5-TCP (3.8/2), 2,3,4,6-TTCP (4.2/2) 235, 233</p> <p>PCP (5.1/2)</p> <p>237</p>
<p><b>Agregados inversos de 1-decanol en THF:agua</b></p>	<p><b>PAHs: INTERACCIONES HIDRÓFOBAS</b></p>	
		<p>BaA y Cris (5.9) 99-595<sup>c</sup> 105-630<sup>c</sup> 103-623<sup>c</sup></p> <p>BbF y BkF (6.4) 99-595<sup>c</sup> 97-602<sup>c</sup> 95-574<sup>c</sup></p> <p>BaP (6.4)</p> <p>DahAn (7.1)</p> <p>BghiP (6.9)</p> <p>IP (6.9)</p>
<p><b>Hemimicelas de alquilcarboxilatos sobre nanopartículas magnéticas</b></p>	<p><sup>a</sup>FC: factor de concentración real del método [<math>V_{muestra}/V_{final} * \text{Recuperación (\%, tanto por uno)}</math>]; <sup>b</sup>Calculado con <i>Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V9.04 for Solari</i>; <sup>c</sup>factor de concentración real máximo considerando una etapa final de evaporación-concentración (volumen final 0.5 mL). <i>Abreviaturas:</i> BPA: bisfenol A; BPF: bisfenol F; BADGE: éter diglicidílico de bisfenol A; BFDGE: éter diglicidílico de bisfenol F; PAHs: hidrocarburos policíclicos aromáticos; BaA (benzo[a]antraceno); Cris (criseno); BbF (Benzo[b]fluoranteno); BkF (benzo[k]fluoranteno); BaP (benzo[a]pireno); DahAn (dibenzo[a,h]antraceno); BghiP (benzo[g,h,i]perileno); IP (Indeno[1,2,3-cd]pireno); OTA (ocratoxina A)</p>	

### 3.2. Mezcla de disolventes tetrahidrofurano(THF)-agua

La mezcla THF:agua es la fase en la que se produce la autoasociación de los ácidos carboxílicos en agregados de micelas inversas para formar los correspondientes SUPRASs. Debido a la analogía estructural de los ácidos carboxílicos y los PFCs, la agregación de estos compuestos anfífilos en forma de micelas inversas en la mezcla THF:agua es muy probable y podría explicar la elevada capacidad de solubilización de la misma para PFCs.

Las constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ) y los valores del parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ ) para ambos disolventes son muy diferentes:  $\delta_{\text{agua}} = 23.3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ;  $\delta_{\text{THF}} = 9.5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ;  $\epsilon_{\text{agua}} = 80$  y  $\epsilon_{\text{THF}} = 7.5$ . Gracias a estas propiedades el disolvente de THF:agua proporciona un balance de interacciones (dispersivas, puentes de hidrógeno y polares) adecuadas tanto para la solubilización de la parte polar como de la cadena hidrófoba del tensioactivo para un amplio intervalo de compuestos en cuanto a la longitud de cadena hidrocarbonada (ver figura esquemática 3.2.a).

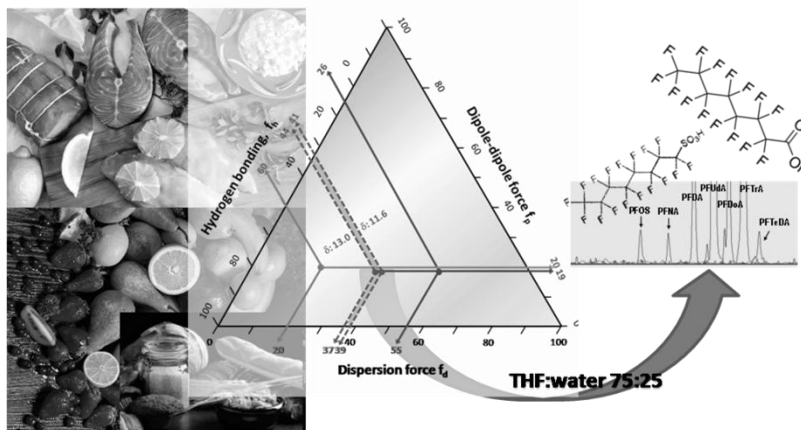


Figura 3.3.a. Representación esquemática de la mezcla THF:agua seleccionada en función de las interacciones proporcionadas para la solubilización de PFCs

#### **4. PRE-TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA**

---

Las muestras seleccionadas en estas investigaciones generalmente requieren llevar a cabo algunas etapas simples de pre-tratamiento previo a la extracción. Así, las aguas naturales o residuales, una vez recogidas y transportadas al laboratorio, se filtran y se acidifican (con ácido clorhídrico o nítrico concentrado) para asegurar su conservación hasta el análisis. El valor de pH al que se ajustaron las muestras fue de  $\sim 2$  para las muestras analizadas con SUPRASs y de  $\sim 4.5$  en el caso de las analizadas con nanopartículas magnéticas, valores óptimos para cada metodología de extracción.

Respecto a los alimentos líquidos, los refrescos carbonatados y la cerveza fueron desgasificados con ultrasonificación (30 min). Las muestras de cerveza también requirieron una dilución 1:1 v/v con agua destilada para disminuir la concentración en proteínas, las cuales dificultan la posterior formación del SUPRASs. Además, todas las muestras de alimentos líquidos con pH superior a 3.5 fueron acidificadas a este valor, ya que en la etapa de generación del disolvente, la muestra debe encontrarse a pH inferior a 4 para asegurar que los ácidos carboxílicos se encuentren protonados y se forme el SUPRASs de micelas inversas. Las muestras de alimentos sólidos fueron liofilizadas previamente a la extracción, para eliminar el contenido de agua (de hasta un 80% en peso en carnes y pescados) y hacer así más robusta la extracción.

Las muestras de aguas naturales y residuales se conservaron en el frigorífico ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) en envases de vidrio de ámbar cerrados una vez pre-tratadas hasta el análisis. Las muestras de alimentos líquidos se conservaron según las indicaciones del envase y las de alimentos sólidos liofilizados se almacenaron en botes cerrados de polipropileno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El análisis de PAHs requiere el uso de una estrategia específica de conservación dada su capacidad de adsorción a la superficie de los recipientes

que los contienen<sup>206,207</sup>. Se han descrito diferentes métodos de conservación que incluyen la adición a la muestra de disolvente orgánico (acetonitrilo, isopropanol o metanol en porcentajes entre 20 y 40% v/v)<sup>208</sup> o de agregados de tensioactivo<sup>209</sup>. En nuestras investigaciones se han evaluado diferentes estrategias de conservación. Así, para el método de extracción con SUPRAS, la adición a la muestra acuosa de un 10% v/v de THF (cantidad usada para la formación del SUPRAS) no fue suficiente y sólo redujo la pérdida por adsorción de PAHs en cierto grado (de 69-80% sin THF a 27-64% con THF tras una semana). La adición de SUPRASs a las muestras almacenadas permitió la recuperación de los PAHs adsorbidos sobre los botes de vidrio tras 1 y 2 días de almacenamiento (periodo en el que ocurre la mayor pérdida de estos contaminantes) utilizando tiempos de agitación de 40 y 60 min, respectivamente. Para evitar estos largos tiempos de extracción, se propuso la adición de los agentes para formar el SUPRAS (ácido decanoico y THF) a la muestra inmediatamente después de su recogida, su extracción (por simple agitación mecánica) y su conservación en botes cerrados a temperatura ambiente durante al menos un mes. La conservación de los PAHs en los extractos de SUPRAS después de la extracción (4°C, viales cerrados) fue posible en un periodo de al menos un mes.

Para la extracción de PAHs con nanopartículas magnéticas se evaluaron dos estrategias: adición de un volumen de metanol (5-30% v/v) y adición del tensioactivo bromuro de tetrabutilamonio (TBABr, 1-500 mg/L). La adición de 50 mg/L de TBABr fue la estrategia elegida ya que la presencia de disolvente orgánico provocó una disminución en los rendimientos de aproximadamente 10-30% al afectar al equilibrio de partición. En cambio, la adición de TBABr permitió estabilizar los PAHs a través de interacciones hidrófobas y pi-cación con los monómeros del tensioactivo, aún encontrándose a una concentración (0.15 mM) muy inferior a la cmc (75 mM). Esta estrategia permitió conservar los PAHs en las muestras durante al

---

<sup>206</sup> D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29.

<sup>207</sup> A. López, E. Blanco, J.I. García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 264 (1992) 241.

<sup>208</sup> R.K. Symons, I. Crick, *Anal. Chim. Acta* 151 (1983) 237.

<sup>209</sup> V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Alfonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 291.

menos cinco días. El uso de cantidades superiores de TBABr no aumentó el tiempo de conservación de los PAHs.

Otro aspecto a tener en cuenta en la etapa de pre-tratamiento de la muestra es la posible contaminación de la misma cuando se analizan compuestos que pueden estar presentes en los materiales de laboratorio o en los instrumentos o equipos de análisis. Este es el caso del bisfenol A y los compuestos perfluorados, que son componentes de materiales plásticos como resinas epoxi o policarbonatos y teflón, respectivamente. En este caso es necesario analizar blancos del procedimiento de forma rutinaria y en el caso de encontrar contaminación identificar las posibles fuentes y reducirla. Para los compuestos perfluorados fue necesario cambiar las líneas de toma de disolvente del cromatógrafo de líquidos que eran de teflón por otras de material *peek* y colocar una columna cromatográfica  $C_{18}$  entre la bomba y el inyector para evitar la co-elución de posible contaminación procedente del sistema cromatográfico. Además se usó nitrógeno ultrapuro (99.999%) para la evaporación de las muestras y material desechable de polipropileno (tubos de centrifuga, pipetas y viales).

## **5. OPTIMIZACIÓN, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS**

---

### ***5.1. Selección del sistema de extracción***

Con el fin de proponer el sistema de extracción más adecuado para cada grupo de contaminantes, se seleccionó el tipo de anfífilo (ácidos carboxílicos  $C_8$ - $C_{14}$  o alcoholes alifáticos  $C_7$ - $C_{14}$ ) y concentración del mismo y de THF en el caso de SUPRASS, para generar disolventes de distinta composición y microestructura. Para los adsorbentes supramoleculares de nanopartículas de magnetita se evaluaron distintas sales de alquilcarboxilatos ( $C_{10}$ - $C_{18}$ ) y en el caso de la mezcla THF:agua, se optimizó la composición.

## **5.2. Optimización de las variables experimentales**

Los dos parámetros clave en la optimización de un método de extracción-concentración son el rendimiento de extracción (R,%) y la relación de volúmenes de fases (RVF) o factor de concentración teórico (FCT; Volumen (o peso)<sub>muestra</sub>/Volumen (o peso)<sub>final</sub>). El factor de concentración real (FCR) se deriva de ambos parámetros ( $FCR = RVF \cdot R / 100$ ) e indica el nivel de preconcentración del método y por tanto los límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs) que se pueden alcanzar. Para simplificar el proceso de optimización se utilizó agua destilada (sistemas supramoleculares) o muestras blanco de pescado (THF:agua).

Como regla general, en el proceso de optimización de las distintas variables, se pretendió obtener el máximo factor de concentración real con rendimientos superiores al 75%. La variable fundamental a optimizar en todos los casos fue la cantidad de disolvente o adsorbente respecto a volumen (o peso) de muestra, la cual determina los rendimientos y los FCRs. Otras variables como pH, fuerza iónica o temperatura, sirvieron para evaluar la robustez del método. También se ensayaron el tiempo de agitación y de centrifugación y se optimizó la síntesis del material (tiempo de reacción y concentración de tensioactivo) y de una etapa de extracción en fase sólida como limpieza para el análisis de PFCs.

## **5.3. Características analíticas del método**

### **5.3.1. Sensibilidad**

Una vez hallados los límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs) del instrumento a partir de blancos instrumentales con señal/ruido 3 y 10, respectivamente, los LDs y LQs del método se estimaron usando extractos de muestras blanco (sometidas al proceso completo de extracción) y fortificadas a niveles muy bajos (teniendo en cuenta una señal/ruido de 3 y 10) así como los factores de concentración real previamente calculados.

### **5.3.2. Selectividad**

En el caso de sistemas supramoleculares, la existencia de efecto matriz o posibles interferencias se hizo en base a la construcción de rectas de calibración sobre extractos de muestras blanco (sin presencia del contaminante) y representativas de las matrices estudiadas, fortificadas antes o después de la extracción. Las pendientes obtenidas se compararon con aquellas obtenidas para rectas construidas usando SUPRASs formados en agua destilada (fortificados antes o después de la extracción) y/o en disolvente orgánico. Tras aplicar un test de la  $t$  adecuado<sup>210</sup> para la comparación de pendientes se concluyó en todos los estudios que las diferencias no eran significativas y no había por tanto efecto matriz.

En el caso de la metodología con THF:agua, en la que se usó espectrometría de masas como técnica de detección-cuantificación, se usaron estándares de recuperación e inyección para evaluar y corregir los efectos matriz de supresión o mejora de la señal (y una columna perfluorada con selectividad suficiente para separar las interferencias de masas). Estos aspectos son discutidos en profundidad en el apartado 8.4.

### **5.3.3. Precisión**

La precisión de los métodos se estableció para cada analito en base a la desviación estándar relativa obtenida en el análisis de once muestras independientes y representativas de las matrices para las que se propone.

## **5.4. Validación en muestras reales**

Una vez optimizado cada método en agua destilada o muestra blanco representativa, se evaluó su aplicabilidad a un número de muestras que varió entre 7 y 19 en las distintas metodologías de muestras reales ambientales y de alimentos. Debido a la ausencia de materiales de referencia certificados en la

---

<sup>210</sup> L. Cuadros-Rodriguez, A.M. García-Campana, F. Alés-Barrero, C. Jiménez-Linares, M. Román-Ceba, J. AOAC Int. 78 (1995) 471.



mayoría de los casos, la validación se hizo fortificando las muestras a varios niveles, incluyendo valores bajos (2-5 veces el límite de cuantificación) y concentraciones comúnmente halladas en concordancia con los datos recogidos en la bibliografía.

En el caso de compuestos perfluorados en alimentos, se dispuso de un material validado por un estudio interlaboratorio (pescado de platija)<sup>211</sup> que se empleó para validar la metodología de extracción con THF:agua.

## **6. SISTEMAS DE SEPARACIÓN-DETECCIÓN EMPLEADOS**

---

La determinación de los contaminantes se hizo a través de cromatografía de líquidos (CL) acoplada a un detector de fluorescencia o un detector de masas en tándem (MS<sup>2</sup>) para proporcionar suficiente selectividad en las muestras más complejas (bisfenol A en refrescos y PFCs en alimentos sólidos). En la tabla Tabla 1.2.a se muestran las características cromatográficas y de detección de los métodos propuestos.

---

<sup>211</sup> J.W. Martin, K. Kannan, U. Berger, P. de Voogt, J. Field, J. Franklin, J.P. Giesy, T. Harner, D.C.G. Muir, B. Scott, M. Kaiser, U. Jarnberg, K.C. Jones, S.A. Mabury, H. Schroeder, M. Simcik, C. Sottani, B. van Bavel, A. Karrman, G. Lindstrom, S. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 248A.

**Tabla 1.2.a Características de cromatografía y detección de los métodos basados en SUPRAS de micelas inversas propuestos en las investigaciones que se recogen en esta Memoria**

<i>Contaminante/ muestra</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Fase estacionaria</i>	<i>Tiempos de retención</i>	<i>Detector</i>
Grupo de bisfenoles/ aguas naturales y residuales		Hipersil ODS C <sub>18</sub> (5µm,4.6mm×15cm)	3.7-10.7	Fluorescencia (λ <sub>ex</sub> ;λ <sub>em</sub> ):280nm /306 nm
PAHs/ aguas naturales y residuales		Supelcosil TM LC-PAH (5µm,4.6mm×25cm) o Supelcosil TM LC-PAH (3µm,3mm×10cm) <sup>c</sup>	13.2-26.3 <sup>a</sup> o 5.1-19.6 <sup>b</sup>	Fluorescencia (λ <sub>ex</sub> ;λ <sub>em</sub> ): Cris and BaA (266 nm/ 384 nm); BbF, BkF y BaP ( 284 nm/404 nm); DahAn (260 nm/420 nm); IP (284 nm/496 nm)
Ocratoxina A (OTA)/alimentos líquidos	<sup>a</sup> Acetonitrilo: agua en gradiente	Hipersil ODS C <sub>8</sub> (5µm,4.6mm×15cm)	15.8	Fluorescencia (λ <sub>ex</sub> ;λ <sub>em</sub> ):334 nm/460 nm
Benzo[a]pireno/alimentos líquidos	<sup>a</sup> Acetonitrilo: agua en gradiente	Hipersil ODS C <sub>8</sub> (5µm,4.6mm×15cm)	15.6	Fluorescencia (λ <sub>ex</sub> ;λ <sub>em</sub> ):284 nm/404 nm
Bisfenol A /alimentos líquidos		Hipersil ODS C <sub>8</sub> (3µm,2.1mm×5cm)	8.1	Espectroscopía de masas con ionización por electrospray (modo negativo) y trampa iónica en tándem. Voltaje del capilar, 5.0 kV; voltaje salida capilar, -165V; skimmer, -44 V; trap drive, -31, temperatura de la fuente, 350 °C; gas secado, 5 Lmin <sup>-1</sup> ; nebulizador,80 psi Fragmento de cuantificación: [M-H-CH <sub>3</sub> ]-
Compuestos perfluorados	Metanol: agua (6.3mM de formiato amónico, pH 4) en gradiente	Fluorosep RP Octyl (5µm,2.1mm,15 cm)	14.4-52.8	Espectroscopía de masas con ionización por electrospray (modo negativo) y triple cuadrupolo en tándem Voltaje del capilar, 1.0 kV; temperatura de la fuente, 325 °C; gas secado, 6 Lmin <sup>-1</sup> ; nebulizador,25 psi Fragmentos de cuantificación: [M-COOH]- para ácidos y [M-SO <sub>3</sub> ]- para sulfonatos
Clorofenoles, aguas naturales	Metanol: agua (ambos con 1% v/v de ácido acético) en gradiente	Ultrabase C <sub>18</sub> (5 µm, 4.6 mm, 25 cm)	10.6-19.1	Ultravioleta: 2,4-DCP (286 nm); 2,4,5-TCP y 2,4,6-TCP (290 nm); 2,3,4,6-TTCP (300 nm) y PCP (304 nm)

<sup>a</sup>Fase móvil con un 1% v/v de ácido acético en agua y acetonitrilo para OTA; <sup>b</sup>Método con SUPRAS; <sup>c</sup>método con adsorbente supramolecular magnético.

La cromatografía de líquidos es el sistema de separación más adecuado para extractos de SUPRAS, debido al alto contenido en tensioactivo de estos disolventes. El tensioactivo (ácidos carboxílicos o alcoholes de cadena larga en este caso) se solubiliza en la fase móvil y los agregados se destruyen al ser arrastrados por ella, eluyéndose como un único pico cromatográfico correspondiente al monómero. No obstante, si el contenido inicial en agua de la fase móvil (>50%) y/o el volumen de inyección son altos (>50  $\mu\text{L}$ ), la presencia de tensioactivo procedente del SUPRASs puede dar lugar a una pseudofase al inicio del programa de gradiente por no llegar a destruirse los agregados. Por este motivo, en este tipo de métodos se comprobó que los picos cromatográficos no variaron en tiempo y forma en los extractos con respecto a estándares hechos con disolvente orgánico, lo cual permitió construir las curvas de calibrado en acetonitrilo o metanol. Cuando el sistema de detección es espectroscopía de masas, la ventana de elución del tensioactivo no puede coincidir con la del analito y debe enviarse a desecho para evitar el ensuciamiento de la fuente de ionización y la consecuente pérdida de señal.

La fase móvil consistió siempre en una mezcla binaria acetonitrilo:agua en gradiente, a excepción de la empleada para compuestos perfluorados (metanol:agua). Se añadió un 1% v/v de ácido acético en ambos canales de fase móvil para el análisis de OTA y clorofenoles y un buffer de formiato amónico (6.3mM, pH 4) en agua en el caso de compuestos perfluorados. Se usaron columnas cromatográficas estándar  $C_{18}$  o  $C_8$  o específicas para la separación de compuestos muy similares en el caso de PAHs, o con mecanismos de retención selectivos para evitar interferencias de masas en la aplicación a compuestos perfluorados (columna  $C_8$  perfluorada). En el caso de PAHs, el uso de una columna de menor diámetro interno, 3 mm (metodología con adsorbente magnético) en lugar de 4.6 mm (metodología basada en SUPRAS), permitió reducir el flujo de la fase móvil de 1.5 a 0.6 mL/min y ahorrar así en disolvente.

Respecto a las características de detección, cabe destacar el bajo voltaje del capilar que fue empleado para la determinación de compuestos perfluorados

(1000 V frente a los valores estándar de 3500-5000 V). A pesar de que este parámetro influye directamente en la sensibilidad, fue necesario adoptar una solución de compromiso para evitar la descarboxilación de los ácidos en la fuente, dando lugar a una pérdida de señal en la transición  $M-[M-COOH]-$

## **7. MÉTODOS RÁPIDOS DE EXTRACCIÓN BASADOS EN SUPRASS DE MICELAS INVERSAS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS**

---

### **7.1. Metodología de extracción**

La metodología de extracción con SUPRASs (ya especificada en la sección 3.4. de la introducción del Bloque I), conlleva las siguientes etapas: a) generación *in situ* del disolvente supramolecular en un tubo de centrifuga de cuello estrecho, disolviendo una determinada cantidad de ácido carboxílico en THF y adicionando luego la muestra acuosa que causa la separación de fases y la aparición del SUPRAS; b) extracción mediante agitación magnética; c) centrifugación; d) medición del volumen de SUPRAS; e) extracción de una alícuota de SUPRASs e inyección en el sistema de cromatografía de líquidos.

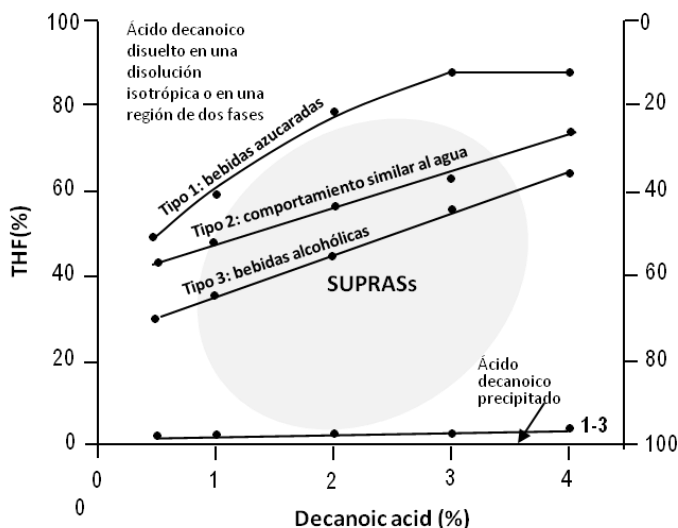
### **7.2. Optimización del método**

#### **7.2.1. Diagramas de fases**

Los SUPRASs de micelas inversas se forman en presencia del anfífilo disuelto en una mezcla de THF y agua tras un proceso de separación de fases. Tal y como se explicó en la sección 3.1. de la introducción del Bloque I, el SUPRAS se origina en una disolución con unos intervalos definidos de concentraciones de anfífilo, THF y agua y esta región de formación puede representarse en un diagrama de fases. Para las aplicaciones analíticas, estos diagramas se construyen en un intervalo de concentraciones bajas de tensioactivo (1-5 % w/v), que son las útiles para proporcionar altos factores de concentración teóricos. El intervalo de composición de la mezcla

THF:agua viene definido por un mínimo de disolvente orgánico (o máximo de agua) por debajo del cual el anfífilo precipita, y un máximo, por encima del cual el SUPRASs se disuelve y ya no tiene lugar la separación de fases. En el caso de muestras de aguas naturales o residuales, los componentes de la matriz, al estar muy diluidos, no afectan de forma significativa al diagrama de fases o a los volúmenes de SUPRASs obtenidos. En las investigaciones desarrolladas en esta Memoria se estudió por primera vez la posibilidad de formar los SUPRASs de micelas inversas en muestras de alimentos líquidos, actuando éstos como agentes coacervantes dado su alto contenido en agua (0.87-0.99 g/mL en las matrices ensayadas). Los componentes de la matriz influyeron ligeramente en los diagramas de fases, que fueron en cualquier caso lo suficientemente amplios para aplicaciones analíticas.

Como se muestra en la figura 7.2.a, los alimentos líquidos ensayados mostraron diagramas de fases de tres tipos. El *tipo 1* corresponde a bebidas azucaradas, como refrescos y zumos (97-123 mg/mL de azúcar) y mosto (164 mg/mL de azúcar), que mostraron una región de coacervación más amplia que cuando se usa agua y una interfase por encima de la cual THF y agua son inmiscibles. Se demostró que este comportamiento se produce en presencia de azúcares a concentraciones superiores a 90 mg/mL. Una posible explicación a este fenómeno es que el azúcar disminuye la actividad del agua provocando la disminución de los puentes de hidrógeno disponibles, del mismo modo que ocurre en fenómenos de *salting-out* en disoluciones concentradas en sal y que provocan la separación de fases en mezclas similares (p.ej. la presencia de 400 mg/mL de  $MgSO_4$  y 50 mg/mL de NaCl causan la inmiscibilidad de una mezcla 50:50 % v/v de agua: acetonitrilo).



### 7.2.a. Diagramas de fases de SUPRASs de micelas inversas en alimentos líquidos

Las bebidas alcohólicas como vinos (10-13% v/v de etanol) y cerveza (3-5% v/v de etanol) mostraron un diagrama de fases *tipo 3* con una interfase inferior y una superior más baja. Esto indica que el SUPRAS se forma y se disuelve con menor contenido en THF en la disolución inicial, debido a la presencia en la matriz de un disolvente orgánico adicional (etanol). Este hecho fue comprobado construyendo diagramas de fases de ácido decanoico en mezclas THF:agua:etanol, con una concentración del último de entre 0 y el 15% v/v.

Otro tipo de bebidas como refrescos con bajo contenido en azúcar, vinagre e infusiones, mostraron diagramas de fases de *tipo 3* (igual al del agua).

Por último se observaron precipitados en formas de capas finas y densas debajo de la fase líquida del SUPRAS en muestras de cerveza y de vino tinto, siendo de color blanquecino y rojo, respectivamente. Se identificaron los taninos condensados en vino tinto (~0.65 mg/mL) y las proteínas en la

cerveza (~4.5 mg/mL) y en el zumo de naranja (~5.9 mg/mL) como los componentes de la matriz aglutinados, extraídos y precipitados de esta forma en el SUPRAS. Para ello se observó el aspecto del SUPRAS de ácido decanoico formado en mezclas de THF:agua con presencia de distintas concentraciones de proteínas y taninos. Para operar con este tipo de matrices se recomienda usar porcentajes de THF inicial de al menos 10% v/v y tiempos de centrifugación de al menos 30 minutos, de modo que se facilite la separación de estos componentes de la fase líquida del SUPRAS. En el caso de la cerveza fue necesaria además una dilución 1:1 v/v con agua destilada.

### **7.2.2. Optimización de las variables experimentales.**

Las variables más influyentes en el diseño de un método de extracción con SUPRASs es la selección de la concentración de sus componentes o la del agente coacervante, ya que vamos a definir así la composición y microestructura del SUPRASs generado y por tanto sus propiedades extractivas.

Hasta la fecha se han descrito SUPRASs de micelas inversas en mezclas de THF:agua formadas por ácidos carboxílicos saturados de cadenas entre 8 y 16 átomos de carbono e insaturados como oleico (18 carbonos). Los SUPRASs de ácidos carboxílicos de cadena más larga requieren un mayor contenido mínimo en THF para su formación; así por ejemplo se necesitan porcentajes de al menos 4, 7, 15 y 27 % v/v para SUPRASs constituidos por 1% (w/v) de ácido de 10, 12, 14 y 16 átomos de carbono, respectivamente. Por este motivo se suelen seleccionar longitudes de cadena de 8-10 átomos de carbono, de modo que se reduzca al máximo el consumo de disolvente orgánico. Además, los tensioactivos de cadena más larga son más insolubles y pueden requerir un cambio de pH o dilución con disolvente orgánico antes de su introducción en el sistema de CL para evitar precipitaciones. No obstante, su uso también puede ser interesante en metodologías que incluyan etapas de limpieza de eliminación del tensioactivo o para evitar la co-elución cromatográfica con analitos de polaridad semejante a la de los ácidos de cadena más baja.

En la Tabla 7.2.a se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la eficiencia de extracción de bisfenoles usando anfífilos de varias longitudes de cadena.

<b>Tabla 7.2.a. Eficiencias de extracción de bisfenoles para SUPRASs de diferentes ácidos (C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>) con un 20% v/v de THF</b>				
Ácido carboxílico (1%)	Recuperación ± S (n=3, %)			
	BPA	BPF	BADGE	BFDGE
Octanoico	87±2	91±2	88±4	86±2
Decanoico	94±2	96±3	93±2	93±5
Dodecanoico	94±3	95±4	91±3	90±4
Tetradecanoico	79±4	82±3	85±2	85±4

Los ácidos octanoico y tetradecanoico proporcionaron rendimientos de extracción ligeramente más bajos, 87-91% y 79-85%, respectivamente, que decanoico y dodecanoico (>90%). El ácido decanoico fue seleccionado en ésta y en las demás aplicaciones como óptimo.

La tendencia a proporcionar rendimientos de extracción más bajos al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del anfífilo (mayor hidrofobicidad) parece estar relacionada con un menor contenido en agua del SUPRAS en iguales condiciones de coacervación (composición de la mezcla binaria THF:agua) lo cual da lugar a una estructura más compacta. Este comportamiento será discutido en la sección 5.

Una vez seleccionado el anfífilo, las variables concentración de THF y de ácido carboxílico son las más influyentes en la metodología y las primeras a optimizar. El contenido en THF se traduce en un determinado contenido en agua en la mezcla binaria, que es en realidad el agente coacervante del sistema, aunque nos referimos a THF por resultar más intuitivo al ser el componente en menor proporción de la mezcla.

Al aumentar el porcentaje de THF y de ácido en la mezcla inicial aumenta el volumen de SUPRAS y disminuye el factor de concentración teórico o la



relación de volúmenes de fases. Al mismo tiempo aumentan los rendimientos de extracción, teniendo que adoptar siempre una solución de compromiso para alcanzar la sensibilidad requerida y un rendimiento cuantitativo.

La relación entre la concentración de ácido carboxílico y el volumen de SUPRAS (manteniendo la composición de la mezcla binaria agua:THF constante) es lineal y el valor de la pendiente indica la concentración de tensioactivo en el disolvente. En cambio, el aumento de volumen del SUPRAS con el incremento de la concentración inicial de THF es exponencial, lo cual se traduce en un contenido creciente en disolvente orgánico en la fase rica en tensioactivo. No obstante, la cantidad total de tensioactivo en el SUPRAS se mantienen prácticamente constante en todo el intervalo de composiciones THF:agua ensayadas, quedando una cantidad insignificante en equilibrio.

En la Tabla 7.2.b se muestran las ecuaciones que describen la influencia de la cantidad de ácido decanoico y la concentración de THF iniciales en los volúmenes de SUPRAS obtenidos tras la separación de fases. En el caso de alimentos líquidos estos volúmenes pueden variar ligeramente, por ejemplo para el vino los volúmenes aumentan debido a la presencia de un 10-13% (v/v) de etanol que actúa como una cantidad de disolvente orgánico adicional al THF en el proceso de coacervación.

Para muestras de agua se propuso una ecuación predictiva del volumen de SUPRAS en función de las dos variables que lo determinan: cantidad de ácido y concentración de THF iniciales. Para ello se aplicó un modelo estadístico de regresión no lineal (modelo iterativo) usando un total de 60 datos. La ecuación resultante fue  $y = 1.035 a e^{0.04731b}$  ( $R^2 = 0.995$ ); donde  $y$  es el volumen de SUPRAS en  $\mu\text{L}$ ,  $a$  la cantidad inicial de ácido decanoico en mg y  $b$  la concentración inicial de THF (% v/v). Esta ecuación resulta útil para estimar en muestras (especialmente de aguas naturales) la relación de volúmenes de fases que se va a obtener bajo diferentes condiciones experimentales sin la necesidad de hacer mediciones en cada punto y simplificar el proceso de optimización. No obstante, una vez optimizado el método, se recomienda medir los volúmenes de SUPRAS durante al análisis

de muestras reales, ya que los componentes de la matriz pueden influir ligeramente, especialmente en el caso de alimentos donde la influencia es clara y serían sólo valores orientativos.

**Tabla 7.2.b Ecuaciones que describen la relación lineal ( $y = a + bx$ ) entre el volumen de SUPRAS ( $y$ ,  $\mu\text{L}$ ) y la cantidad de ácido decanoico ( $x$ , mg) para distintos valores de THF y la relación exponencial ( $y = b_0 e^{b_1 z}$ ) entre el volumen de SUPRAS ( $y$ ,  $\mu\text{L}$ ) y la concentración de THF ( $z$ , %) para distintas cantidades de ácido**

Muestra	$y = a + bx$			$y = b_0 e^{b_1 z}$		
	$b \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{L mg}^{-1}$ )	$a \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{L}$ )	$^a R^2$	$b_0 \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{L}$ )	$b_1 \pm \text{SD}$	$^a R^2$
	<b>5% THF (v/v)</b>			<b>50 mg</b>		
Agua	1.31±0.03	3.46±2.7	0.997	53.43±1.5	0.048±0.001	0.998
	<b>20% THF (v/v)</b>			<b>75 mg</b>		
Agua	2.64±0.03	-3.19±3.3	0.998	75.47±4.57	0.049±0.002	0.992
	<b>30% THF (v/v)</b>			<b>100 mg</b>		
Agua	4.00±0.04	20.1±10.6	0.998	106.5±3.3	0.045±0.001	0.998
	<b>10%</b>			<b>200 mg</b>		
Agua	1.67±0.04	0.7±3.9	0.997	205±7	0.045±0.002	0.996
Cerveza	1.79±0.07	5±26	0.994	220±8	0.046±0.005	0.980
Vino tinto	1.86±0.07	38±38	0.997	237±8	0.045±0.002	0.980
Vinagre	1.64±0.10	7±7	0.990	201±5	0.044±0.006	0.991
Mosto	1.60±0.02	13±9	0.998	205±9	0.048±0.004	0.980
Café soluble	1.71±0.09	-8±10	0.993	210±10	0.046±0.007	0.991
Refresco limón	1.6±0.1	-2±20	0.980	200±4	0.046±0.005	0.992

<sup>a</sup> coeficiente de correlación ;  $n = 8$

Las variables ácido decanoico y THF también determinan los rendimientos. En cuanto al ácido, se optimizó en un intervalo de entre el 0.1 y el 2 % w/v, valores que proporcionan bajos volúmenes de SUPRAS y FCRs altos. Los valores óptimos en los métodos propuestos estuvieron entre el 0.2 y el 0.5 % w/v. Gracias a la alta concentración de anfífilo en los SUPRAS propuestos (~0.6-0.8 mg/ $\mu\text{L}$ ), estas bajas cantidades de tensioactivo proporcionaron rendimientos cuantitativos (>80%) y factores de concentración reales altos (87-288) en todos los métodos. En general, a estas

bajas concentraciones de tensioactivo, no hay grandes variaciones de eficiencia de extracción en un intervalo amplio de polaridad para los analitos ensayados ( $\log K_{ow} \sim 3-7$ , ver tabla 7.2.c), lo cual pone de manifiesto la versatilidad del sistema de extracción. No obstante, pueden observarse ligeras diferencias a concentraciones tan bajas como un 0.25 % w/v (ver tabla), extrayéndose mejor los compuestos más hidrófobos.

<b>Tabla 7.2.c Rendimientos de extracción de distintos contaminantes con SUPRASs formados con cantidades crecientes de ácido decanoico</b>					
<b>Ácido decanoico (% v/v)</b>	<b>Bisfenol A (10 % v/v THF) Log <math>K_{ow}</math>:3.3</b>	<b>Naftaleno<sup>a</sup> (10 % v/v THF) <math>K_{ow}</math>:3.3</b>	<b>2,4,5-Triclorofenol<sup>a</sup> (10 % v/v THF) Log <math>K_{ow}</math>:3.6</b>	<b>Ocratoxina A (10 % v/v THF) Log <math>K_{ow}</math>:4.6</b>	<b>Benzo[a]pireno (10 % v/v THF) Log <math>K_{ow}</math>:6.4</b>
<b>0.1</b>	50±2	54±5	65±1	60±3	64±3
<b>0.25</b>	73±4	71±3	78±3	83±4	90±3
<b>0.5</b>	83±2	81±5	92±3	93±4	95±4
<b>1</b>	92±2	93±3	98±2	98±1	100±2
<b>2</b>	95±4	97±5	98±2	98±2	99±2

n=3; <sup>a</sup>resultados no publicados

El porcentaje de THF al cual se forma el disolvente supramolecular tiene una gran influencia en el rendimiento de extracción. Al aumentar el porcentaje de THF disminuyen los factores de concentración al formarse una fase de mayor volumen (y más diluida en tensioactivo) y pueden también aumentar los rendimientos de extracción al cambiar las propiedades del SUPRAS generado. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con el ácido en todas las condiciones experimentales (se incorpora prácticamente el 100% al SUPRAS), al aumentar el THF en el SUPRASs también aumenta el THF en equilibrio en la muestra acuosa, afectando así al coeficiente de reparto del contaminante. El intervalo de THF estudiado está generalmente comprendido entre el 2.5 y 30% v/v. Como se muestra en la Tabla 7.2.d, los rendimientos de extracción suelen alcanzar un valor óptimo para porcentajes de THF del 10-20%.

<b>Tabla 7.2.d Recuperaciones obtenidas (%) para la extracción de distintos contaminantes con SUPRASs formados a partir de diferentes porcentajes de THF</b>					
<b>THF (%, v/v)</b>	<b>Bisfenol A (0.5% w/v C<sub>10</sub>) Log K<sub>ow</sub>:3.3</b>	<b>Ocratoxina A (0.5% w/v C<sub>10</sub>) Log K<sub>ow</sub>:4.6</b>	<b>Benzo[a]pireno (0.2% w/vC<sub>10</sub>) Log K<sub>ow</sub>:6.4</b>	<b>Naftaleno<sup>a</sup> (0.2% w/vC<sub>10</sub>) Log K<sub>ow</sub>:3.3</b>	<b>2,4,5- Triclorofenol<sup>a</sup> (0.25% w/vC<sub>10</sub>) Log K<sub>ow</sub>:3.6</b>
2.5	61±5	91±4	85±3	64±2	76±2
5	71±4	<b><u>95±1</u></b>	89±1	76±3	<b><u>86±2</u></b>
10	<b><u>83±3</u></b>	<b><u>94±5</u></b>	92±4	<b><u>81±5</u></b>	<b><u>86±3</u></b>
20	81±3	87±3	<b><u>100±3</u></b>	<b><u>79±1</u></b>	84±4
Se subrayan los valores donde se alcanzan los máximos rendimientos.; n=3; <sup>a</sup> resultados no publicados.					

Una de las principales ventajas de los métodos de extracción que usan SUPRAS es su simplicidad y rapidez. En muestras líquidas, el equilibrio de partición se alcanza rápidamente en 1-2min cuando se usa agitación magnética, ya que el disolvente se disgrega en pequeñas gotitas aumentando así la superficie de contacto SUPRAS-muestra. En todos los métodos desarrollados se fijó un tiempo de 5 min de agitación (~ 700 rpm) para asegurar que se alcance el equilibrio.

Otras variables experimentales estudiadas fueron la fuerza iónica (concentración de NaCl), el pH (2-4) y la temperatura (25-60°C). Ninguna de ellas afectó a los rendimientos de extracción o volúmenes de SUPRAS obtenidos, poniendo de manifiesto la robustez del método.

### **7.2.3. Características analíticas de los métodos propuestos**

En la tabla 7.2.e se muestran las características analíticas de los métodos propuestos con SUPRASs. La sensibilidad de los métodos fue suficiente para cumplir con los requerimientos de la legislación vigente (ver tabla 2.a) en las muestras estudiadas a niveles cuantificables a excepción de indeno[1,2,3-cd]pireno (sólo a niveles detectables).

**Tabla 7.2.e Características analíticas de los métodos basados en SUPRASs de micelas inversas propuestos en esta Tesis**

<b>Contaminantes</b>	<b>SUPRAS (condiciones de formación)</b>	<b>Volumen de muestra (mL)</b>	<b>Límite de detección (LD) y cuantificación (LQ) (ng/L)</b>	<b>Precisión</b>
Bisfenol A <sup>a</sup>		10.8	34/111	2-5%
Bisfenol A <sup>b,c</sup>	10% THF y 0.5% ácido decanoico	15	200-215/562-602	6.1%
Bisfenol F <sup>a</sup>				
Bisfenol A éter diglicidílico <sup>a</sup>	5% THF y 0.5% ácido decanoico	10.8	30/98	2-5%
Bisfenol F éter diglicidílico <sup>a</sup>				
Ocratoxina A <sup>b</sup>	10% THF y 0.175% ácido decanoico	15	14-18 (31 en cerveza)/ 4-5 (9 en cerveza)	5.1%
Benzo[a]antraceno <sup>a</sup>				
Criseno <sup>a</sup>	0.175% ácido decanoico	36	0.7/0.3	1-6%
Benzo[b]fluoranteno <sup>a</sup>				
Benzo[k]fluoranteno <sup>a</sup>				
Benzo[a]pireno <sup>a</sup>	5% THF y 0.5% ácido decanoico	15	0.4/0.1	5.4%
Benzo[a]pireno <sup>b</sup>				
Dibenzo[a,h]antraceno <sup>a</sup>	10% THF y 0.2% ácido decanoico	36	1.4/0.4	1-6%
Indeno [1,2,3-cd]pireno <sup>a</sup>				

<sup>a</sup>Aguas naturales y residuales; <sup>b</sup>Alimentos líquidos; la determinación se hizo por cromatografía de líquidos acoplada a fluorescencia excepto en <sup>c</sup> detección por espectrometría de masas MS<sup>2</sup>

La ausencia de interferencias y efecto matriz se comprobó comparando la pendiente de rectas construidas sobre extractos de matriz y sobre disolvente en base a un test de la *t* adecuado, tal como se explicó en el apartado 5.3.2.

#### **7.2.4. Análisis de muestras reales**

Los métodos se aplicaron con éxito al análisis de muestras de aguas naturales, residuales y alimentos líquidos.

<b>Tabla 7.2.f Concentraciones de bisfenoles A y F y éteres diglicidílicos, PAHs y ocratoxina A en las muestras analizadas</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Grupo contaminantes</b>	<b>Contaminante/nº muestras(positivas)/niveles hallados</b>
<b>Influentes de depuradora</b>	<b>Bisfenol A, F y derivados</b>  <b>PAHs</b>	<b>BPA</b> 4(4) 0.96-1.6 µg/L; <b>BPF</b> 3(3) 0.85-1.43 µg/L; <b>BADGE</b> 4(0); <b>BFDGE</b> 4(0)  <b>BaA</b> 3(3) 3.9-35 ng/L; <b>Cris</b> 3(3) 5.2-34 ng/L; <b>BbF</b> 3(3) 6.5-38 ng/L; <b>BkF</b> 3(3) 6.6-34 ng/L; <b>BaP</b> 3(3) 4.1-35 ng/L; <b>DahAn</b> 3(3) 6.9-37 ng/L; <b>IP</b> 3(1) 27 ng/L
<b>Efluentes de depuradora</b>	<b>Bisfenol A, F y éteres diglicidílicos</b>  <b>PAHs</b>	<b>BPA</b> 4(4) 0.26-0.36 µg/L; <b>BPF</b> 4(3) 0.1-1.15 µg/L; <b>BADGE</b> 4(0); <b>BFDGE</b> 4(0)  <b>BaA</b> 3(1) 2.11 ng/L; <b>Cris</b> 3(1) 1.16 ng/L; <b>BbF</b> 3(1) 1.08 ng/L; <b>BkF</b> 3(1) 0.77 ng/L; <b>BaP</b> 3(1) 1.09 ng/L; <b>DahAn</b> 3(1) 1.7 ng/L; <b>IP</b> 3(0)
<b>Aguas de Río</b>	<b>Bisfenol A, F y éteres diglicidílicos</b>  <b>PAHs</b>	<b>BPA</b> 3(3) 0.1-0.32 µg/L; <b>BPF</b> 3(0); <b>BADGE</b> 3(0); <b>BFDGE</b> 3(0)  <b>BaA</b> 3(2) 2.5-4.8 ng/L; <b>Cris</b> 3(2) 3.2-3.4 ng/L; <b>BbF</b> 3(2) 2.2-3.4 ng/L; <b>BkF</b> 3(2) <LOQ-1.39 ng/L; <b>BaP</b> 3(2) 1.46-6.6 ng/L; <b>DahAn</b> 3(2) 1.8-2.2 ng/L; <b>IP</b> 3(0)
<b>Té y mate</b>	<b>Benzo [a] pireno</b>	3(2) 4.9-16.6 ng/L
<b>Café soluble</b>	<b>Benzo [a] pireno</b>	2(1) 1.51 ng/L
<b>Refrescos de soda, limón y té</b>	<b>Bisfenol A</b>	4(2) <LOQ-2.3 µg/L (en refrescos de té)
<b>Vino tinto y blanco; mosto y vinagre de vino blanco</b>	<b>Ocratoxina A</b>	8(2) <LOQ-177 ng/L (en vinagre y mosto)
<b>Cerveza</b>	<b>Ocratoxina A</b>	2(1) <LOQ-115 ng/L

Como se muestra en la tabla 7.2.f, la mayoría de los analitos estudiados estuvieron presentes en las muestras de influentes (procedentes de estaciones depuradoras de Jaén y Córdoba), lo cual pone de manifiesto la necesidad de disponer de métodos rápidos y simples para el análisis de contaminantes prioritarios y emergentes en estas matrices. La excepción a esta ubicuidad fueron los éteres diglicidílicos de bisfenol A y F, de los que sólo el primero fue cuantificado en dos influentes (tampoco fueron detectados en aguas

naturales). La reducción de la contaminación en los efluentes de las estaciones depuradoras fue del ~75% para bisfenoles y prácticamente del 100% para los PAHs al ser contaminantes de mayor hidrofobicidad. Respecto a las muestras de río y pantano, como era previsible, se encontraron niveles muy bajos de contaminación (y acordes a los recopilados en bibliografía), siempre por debajo de las normas de calidad del agua (DIRECTIVA 2008/105/EC) y sólo en algunas muestras. La contaminación más alta de bisfenol A se encontró en el río Dos Torres. Este río recibe influentes domésticos de una planta depuradora que con solamente lleva a cabo un tratamiento mecánico. En el caso de PAHs destacó la presencia de los mismos en el río Guadajoz, en una localización cercana al paso de una autovía y en el pantano de la Breña, donde las actividades acuáticas a motor son frecuentes. En relación a las muestras de alimentos, aproximadamente el 50% estuvieron contaminadas por debajo de los límites legales (REGLAMENTO CE No 1881/2006), a excepción de la concentración de benzo[a]pireno hallada en una muestra de hierba mate (2.1 mg/Kg).

En la siguiente figura se muestran algunos cromatogramas de las muestras analizadas en las que se halló contaminación.

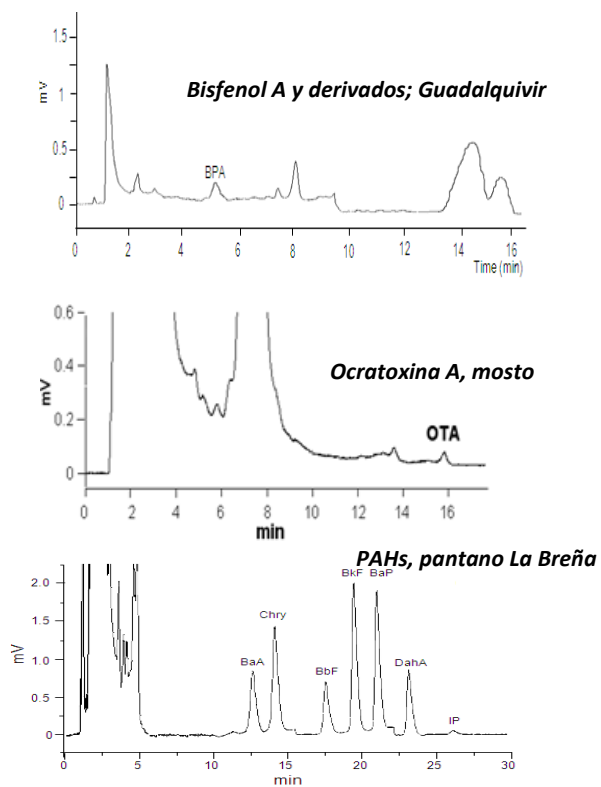


Figura 7.2.b LC-FL cromatogramas pertenecientes a la extracción de contaminantes con SUPRASs de micelas inversas en muestras de aguas naturales y alimentos



## 8. MEZCLAS DE THF: AGUA PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS PERFLUORADOS EN ALIMENTOS A NIVELES DE ULTRA-TRAZA

### 8.1. Metodología de extracción

La metodología de extracción consiste en las siguientes etapas: a) extracción con una mezcla THF:agua (75:25 v/v); b) limpieza con dos cartuchos de extracción en fase sólida en línea (resina de intercambio aniónico y carbón activo); c) evaporación y reconstitución en fase móvil para su inyección en el cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo. En el caso de muestras líquidas, se someten directamente a la etapa de limpieza. En la siguiente figura se esquematiza el proceso de extracción general para alimentos sólidos.

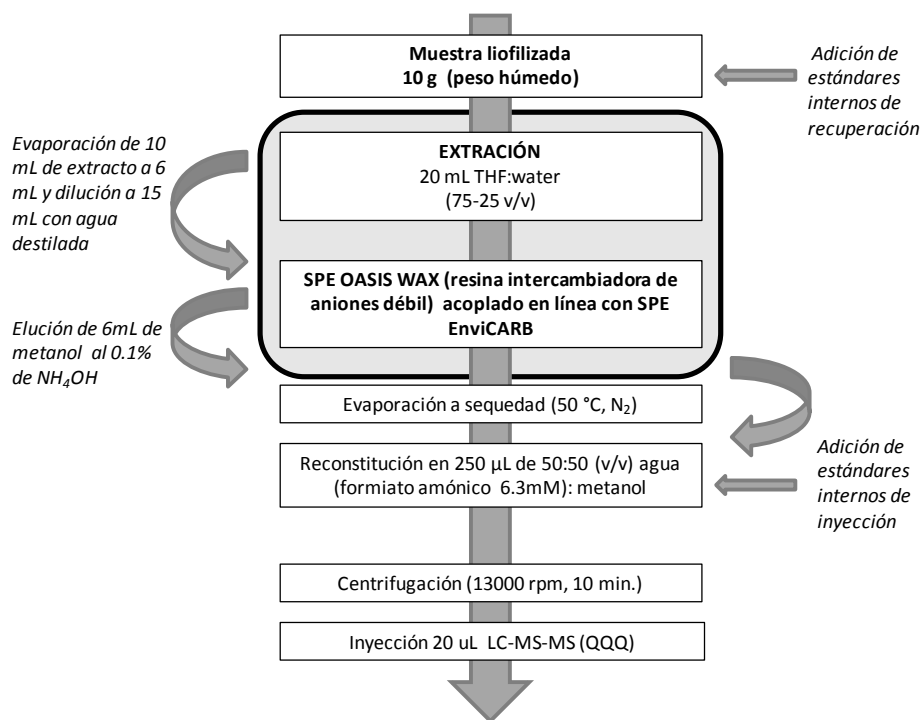


Figura 8.1.a. Esquema del procedimiento de extracción y limpieza de PFCs en alimentos

Se analizaron compuestos perfluorados con grupos ácidos ( $C_4$ - $C_{14}$ ) y sulfonatos ( $C_{45}$ ,  $C_{65}$ ,  $C_{85}$ ) seleccionando una transición para cuantificación y otra para confirmación. Se usaron estándares de recuperación o del método, que fueron añadidos antes de la extracción, con el fin de corregir las pérdidas durante el proceso de extracción y limpieza y los posibles efectos matriz: también se añadieron estándares de inyección (en la etapa de reconstitución) empleados para verificar el buen funcionamiento del equipo e identificar posibles efectos matriz (sin ser usados para la corrección de resultados). En la Tabla 8.1.a se muestran los analitos determinados y las correspondientes transiciones usadas para la cuantificación.

<b>Tabla 8.1.a Transiciones monitorizadas de los compuestos perfluorados y estándares internos del método</b>					
	<b>Compuestos perfluorados</b>		<b>Estándar interno (IS)</b>		
	<i>Cuantificación</i>	<i>Confirmación</i>	<i>IS del método</i>	<i>ISs de inyección</i>	
<b>PFBA</b>	213–169	–	$^{13}C_4$ PFBA	217–172	
<b>PFPeA</b>	263–219	–	$^{13}C_4$ PFBA	217–172	
<b>PFBS</b>	299–80	299–99	$^{18}O_2$ PFHxS	403–84	
<b>PFHxA</b>	313–269	313–119	$^{13}C_2$ PFHxA	315–270	
<b>PFHpA</b>	363–319	363–169	$^{13}C_2$ PFHxA	315–270	
<b>PFHxS</b>	399–80	399–99	$^{18}O_2$ PFHxS	403–84	
<b>PFOA</b>	413–369	413–169	$^{13}C_4$ PFOA	417–372	$^{13}C_8$ PFOA 421–376
<b>PFNA</b>	463–419	463–219	$^{13}C_5$ PFNA	468–423	
<b>PFOS</b>	499–80	499–99	$^{13}C_4$ PFOS	503–80	$^{13}C_8$ PFOS 507–80
<b>PFDA</b>	513–469	513–219	$^{13}C_2$ PFDA	515–470	
<b>PFUdA</b>	563–519	563–269	$^{13}C_2$ PFUdA	565–520	$^{13}C_7$ PFUdA 570–525
<b>PFDoA</b>	613–569	613–319	$^{13}C_2$ PFUdA	565–520	
<b>PFTrA</b>	663–619	–	$^{13}C_2$ PFUdA	565–520	
<b>PFTeA</b>	713–669	713–369	$^{13}C_2$ PFUdA	565–520	
TDC	498.3–107	498.3–80 498.3–124	–		
PFCs con grupo ácido, ión precursor $[M-H]^-$ , ión producto para cuantificación $[M-COOH]^-$					
PFCs con grupo sulfonato, ión precursor $[M-H]^-$ , ión producto para cuantificación $[SO_3]^-$					
<b>Abreviaturas:</b> ácido perfluorobutanoico (PFBA), ácido perfluoropentanoico (PFPeA), ácido perfluorohexanoico (PFHxA), ácido perfluoroheptanoico (PFHpA), ácido perfluorooctanoico (PFOA), ácido perfluorononanoico (PFNA); ácido perfluorodecanoico (PFDA), ácido perfluoroundecanoico (PFUdA), ácido perfluorododecanoico (PFDoA), ácido perfluorotridecanoico (PFTrDA), ácido perfluorotetradecanoico (PFTeDA), perfluoro-1-butanosulfonato potásico (PFBS), perfluoro-1-hexanosulfonato potásico (PFHxS), perfluoro-1-octanosulfonato potásico (PFOS).					

A pesar de la demanda de métodos robustos y simples para el análisis de PFCs por parte de las autoridades alimentarias europeas, actualmente existen pocas metodologías de extracción para compuestos perfluorados (PFCs) en alimentos que proporcionen la sensibilidad requerida a los bajos niveles a los que se encuentran (ng/g–pg/g) y que proporcionen al mismo tiempo rendimientos de extracción altos para el amplio intervalo de polaridad de PFCs y en la variedad de matrices objeto de estudio (vegetales, carne, pescado, etc.).

Los métodos existentes para el análisis de PFCs en alimentos están basados en disolventes de polaridad moderada (metanol o acetonitrilo), lo cual conlleva poca eficiencia de extracción para los PFCs con longitud de cadena corta y larga ( $C_{4-5}$  y  $C_{13-14}$ ) y rendimientos muy dependientes del tipo de matriz. En el esquema 8.1.b se muestran los métodos más representativos<sup>212,213,214</sup>.

El objetivo último de nuestra investigación fue combinar un proceso de extracción cuantitativo, una etapa de limpieza eficaz y un sistema de detección sensible y selectivo para proponer una metodología adecuada para la determinación de PFCs en alimentos a niveles de ultra-traza (pg/g).

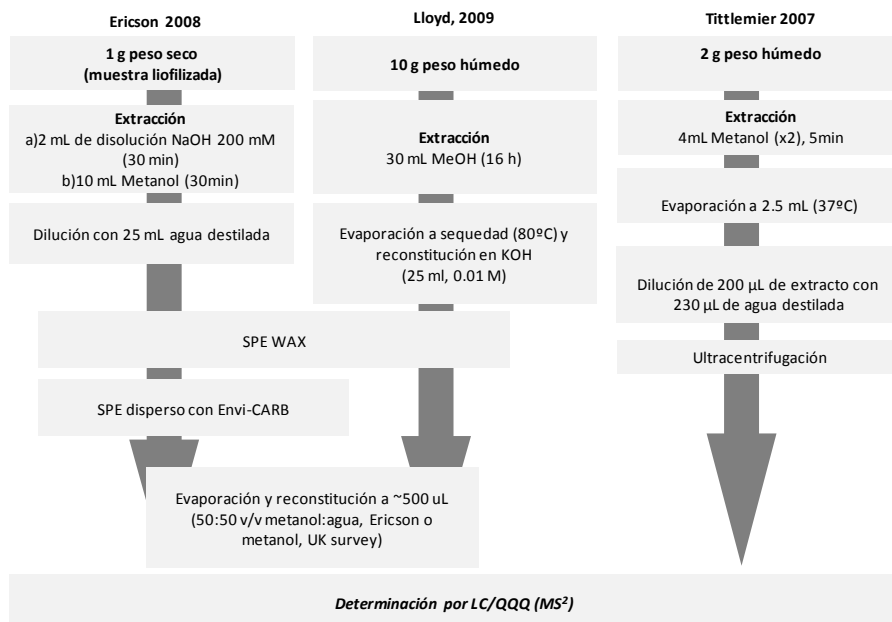
Las cadenas hidrocarbonadas de los PFCs estudiados tienen entre 4 y 14 átomos de carbono y son fuertemente hidrófobas debido a la presencia de flúor, mientras que las cabezas polares tienen grupos donadores y aceptores de hidrógeno. Tal y como se ha explicado brevemente en la sección 3 de este bloque, las mezclas de tetrahidrofurano (THF) y agua poseen una excelente capacidad de solubilización para estos compuestos anfífilos, siendo un buen disolvente para la parte hidrófoba y la polar del tensioactivo.

---

<sup>212</sup> Ericson, I., Nadal, M., van Bavel, B., Lindström, G., Domingo, J.L. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1787-1794.

<sup>213</sup> A.S. Lloyd, V.A. Bailey, S.J. Hird, A. Routledge, D.B. Clarke, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2923.

<sup>214</sup> Tittlemier, S.A., Pepper, K., Seymour, C.; Moisey, J., Bronson, R., Cao, X.-L., Dabeka, R.W. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3203-3210.

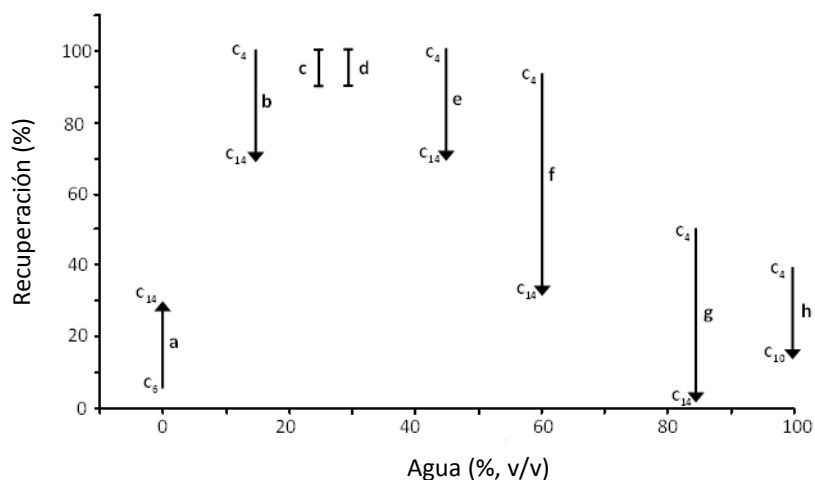


**Figura 8.1.b** Esquema de los métodos analíticos más representativos para la determinación de PFCs en alimentos<sup>212,213,214</sup>

## 8.2. Extractante

El parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta_T$ ) expresa la capacidad de solubilización de un disolvente y está integrado por tres componentes, denominados parámetros de Hansen, que expresan los distintos tipos de interacciones que puede establecer el disolvente con el soluto y que son puentes de hidrógeno ( $\delta_h$ ), interacciones dipolo-dipolo ( $\delta_p$ ) y fuerzas de dispersión ( $\delta_d$ ). Cuando se utilizan mezclas de disolventes, tanto  $\delta_T$  como  $\delta_h$ ,  $\delta_p$  y  $\delta_d$  pueden ajustarse al valor deseado para proporcionar las interacciones requeridas, simplemente variando la composición de la mezcla. En la mezcla THF:agua tanto los valores de  $\delta_T$  ( $\delta_{T\text{-agua}} = 23.3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ;  $\delta_{T\text{-THF}} = 9.5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ ) como las interacciones relativas que proporcionan los dos disolventes son muy diferentes e idóneas para la solubilización de compuestos anfífilos. Así, el agua proporciona puentes de hidrógeno para la solubilización del grupo polar de los PFCs ( $\delta_h > \delta_p \approx \delta_d$ ), mientras que el THF es ideal para la solubilización de la cadena hidrocarbonada.

En la figura 8.2.a se observa que las recuperaciones obtenidas para la extracción de PFCs en muestras de Panga sólo es cuantitativa (líneas c y d) en mezclas con una composición adecuada de THF y agua. Tanto las extracciones con agua como con THF puros son muy poco eficientes y no proporcionan rendimientos superiores al ~30%. En base a estos resultados, se seleccionó como disolvente óptimo una mezcla THF:agua con la proporción 75:25 % v/v y se propuso una etapa de liofilización de las muestras para garantizar esta proporción.



**Figura 8.2.a** Recuperaciones obtenidas para PFCs (C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>) en muestras liofilizadas de *Panga* usando mezclas agua:THF con ratios (v/v) a) 0:100, (b) 15:85, (c) 25:75, (d) 30:70, (e) 45:55, (f) 60:40, (g) 85:15 y (h) 0:100

Los parámetros de Hansen pueden representarse en un diagrama triangular de Teas, transformándolos previamente en parámetros fraccionales ( $f_d$ ,  $f_p$  y  $f_h$ ). Los diagramas de Teas sirven para representar gráficamente las propiedades de solubilización de un disolvente en función de las tres componentes citadas y se usaron para representar las propiedades de solubilización de los disolventes obtenidos con las distintas mezclas THF:agua.

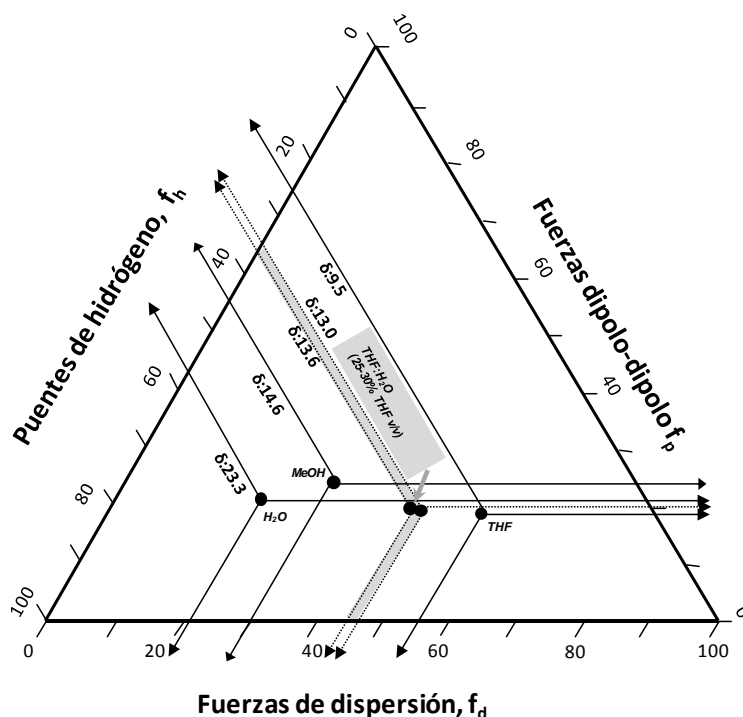


Figura 8.2.b Diagrama de Teas mostrando los valores de los parámetros fraccionales correspondientes a las fuerzas intermoleculares por formación de puentes de hidrógeno ( $f_h$ ), fuerzas dipolo-dipolo ( $f_p$ ) y fuerzas de dispersión ( $f_d$ ) y el parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta_T$ ) de agua, metanol, tetrahidrofurano y de la mezcla tetrahidrofurano-agua óptima para la extracción de PFCs (25-30% v/v THF, zona sombreada en gris).

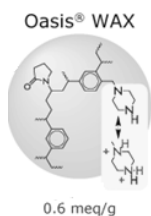
En base a los parámetros de solubilidad de la mezcla THF:agua óptima (75:25, v/v) para la extracción de PFCs (como puede verse en la figura 8.2.b), los disolventes con valores del parámetro de Hildebrand entre 12-14 y parámetros de Teas con ratios de fuerzas polares a no polares ( $f_h+f_p/f_d$ ) de  $\sim 1.2$  serían adecuados para la solubilización de estos contaminantes. En la figura también se ha representado el metanol que es el disolvente más usado en los métodos propuestos para extracción de PFCs en alimentos. En este

caso, las recuperaciones más bajas de los PFCs de longitud de cadena más alta podrían explicarse por un balance inadecuado de fuerzas polares/apolares ( $\sim 2.3$ ).

La ratio óptima de disolvente (75:25 v/v THF:agua) a cantidad de muestra liofilizada se determinó mediante la extracción de muestras representativas con composiciones muy variables en proteínas y carbohidratos, en concreto pescados (arenque y platija), queso, carne de cerdo, pimiento verde y pan. Una ratio 2:1 (20 mL:10 g peso seco) proporcionó rendimientos de los estándares internos de recuperación mayores al  $\sim 75\%$  e independientes del tipo de muestra. Para poder tomar una alícuota de al menos la mitad del volumen del extracto se aumentaron las ratios para muestras de queso y pan (4.1 y 3.1), debido a la alta concentración de grasa ( $\sim 27\%$ ) del primero, dando lugar a separación de fases a ratios más bajas, y a la alta porosidad del pan, impidiendo recolectar una cantidad suficiente de sobrenadante tras la centrifugación.

### **8.3. Limpieza de la muestra**

Para la limpieza de la muestra se siguió el procedimiento comúnmente usado en la mayoría de los métodos propuestos en bibliografía y que consiste en una extracción en fase sólida secuencial con un intercambiador de aniones débil (Oasis WAX, suministrado por Waters) y carbón activo. Con el objeto de simplificar el procedimiento, se usó el carbón activo en cartuchos (ENVI-carb, suministrados por Supelco) que se acoplaron en línea con los cartuchos WAX en la etapa final de elución de estos. El uso de carbón activo disperso (propuesto en la bibliografía) se descartó por hacer necesario el uso varias etapas de centrifugación y trasvases de recipientes o etapas de filtración para obtener un extracto limpio de carbón. Además supuso una pérdida de volumen de extracto ( $\sim 0.5$  mL por 250 mg de carbón activo) y por tanto de factor de concentración del método. Se proporcionaron además una serie de



**Figura 8.3.a Resina de intercambiador de aniones débil Oasis WAX (waters)**

modificaciones al procedimiento convencional para adaptarlo al disolvente de extracción y mejorar el proceso de limpieza.

Los extractos (alícuotas de 10 mL, en el caso del pan 15 mL) se diluyeron con agua para obtener buenas recuperaciones en la extracción en fase sólida. En base a un estudio de composición y volumen de extracto para obtener buenas recuperaciones se seleccionó un óptimo de 25% de THF (que ayudó al paso de la muestra por el cartucho, evitando obstrucciones) y 15 mL de extracto. Gracias a la alta volatilidad del THF los extractos fueron evaporados rápidamente ( $N_2$ ,  $50^\circ C$ ,  $\sim 10$  min) a 6 mL ( $\sim 42\%$  agua) y luego diluidos a 15 mL ( $\sim 77\%$  agua) antes de su paso por los cartuchos.

En la etapa de limpieza de interferencias se sustituyó el metanol (recomendado en bibliografía y casa comercial) por una mezcla de THF:acetonitrilo (ACN) 75:25 % v/v (8 mL). La mayor hidrofobicidad de esta mezcla permitió la eliminación de compuestos muy hidrófobos como pigmentos o lípidos, comúnmente encontrados en las muestras. Además, debido al hecho de que el disolvente THF:ACN no posee grupos donadores de protones es un mal disolvente para los PFCs, que se encuentran principalmente desprotonados, evitando así pérdidas en la etapa de elución. En muestras de frutas y verduras y de aceite se aumentó el volumen de THF:ACN en la etapa de lavado a 12 y 16 mL, respectivamente, para reducir interferencias.

La limpieza adicional con carbón activo fue necesaria especialmente en muestras de carne y pescado, donde al no incluirla aparecieron precipitados de sustancias hidrófobas en los extractos finales reconstituidos (presumiblemente biomoléculas como proteínas), los cuales produjeron pérdidas de PFCs por adsorción.



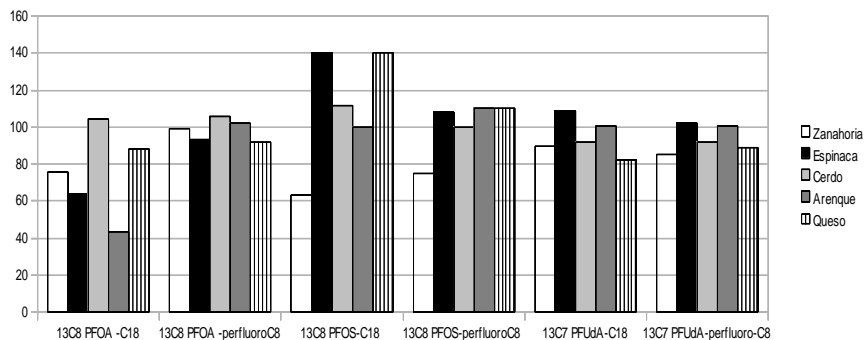
La etapa final de evaporación ( $N_2$ ,  $50^\circ C$ ) y reconstitución (250  $\mu L$ , 50:50, agua con 6.3mM formiato amónico a pH 4: metanol) permitió proporcionar un factor de concentración teórico de 20 veces que se tradujo en límites de detección de pocos pg/g para la mayoría de PFCs.

Después de la reconstitución, las muestras fueron ultracentrifugadas para eliminar posibles sólidos, descartando la filtración con jeringa que conllevó pérdidas de hasta el 20% en algunos PFCs en ciertas muestras.

#### **8.4. Selectividad**

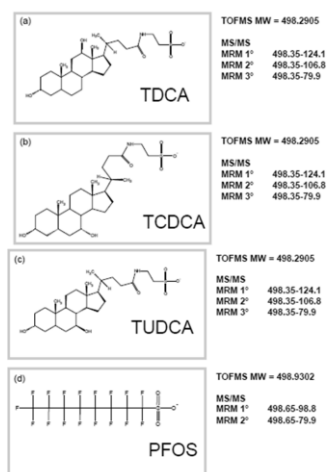
Además del requerimiento de sensibilidad a niveles de ultra-traza, las metodologías para el análisis de PFCs requieren una alta selectividad para evitar efectos matriz e interferencias por co-elución de compuestos con igual masa. Con este objetivo, además de una etapa de *clean-up* eficiente se evaluó el uso de una columna con mecanismos de retención más selectivos para PFCs que el que proporcionan las fases estacionarias comúnmente usadas ( $C_8$  y  $C_{18}$ ). En concreto, se ensayó una fase estacionaria perfluorada  $C_8$  (Fluorosep RP Octyl).

En la figura 8.4.a se muestran las recuperaciones obtenidas para los estándares de inyección correspondientes a PFOA, PFOS y PFUDA en muestras de zanahoria, espinaca, filete de cerdo y arenque y queso utilizando las columnas  $C_{18}$  y perfluoro- $C_8$ . Como se muestra en el gráfico, el uso de la columna perfluorada redujo el efecto matriz en las muestras analizadas.



**Figura 8.4.a** Recuperación de los estándares de inyección en varias matrices con la columna  $C_{18}$  y la  $C_8$  perfluorada.

Asimismo, la columna perfluorada permitió la resolución cromatográfica de las interferencias producidas por ácidos cólicos en muestras de origen animal. Las sales biliares de taurodeoxicolato (ver Figura 8.4.b, contienen un grupo sulfonato y por tanto presentan la misma transición principal que PFOS (499-80). Estos compuestos co-eluyen en columnas cromatográficas comunes como  $C_{18}$ <sup>215,216</sup>, conduciendo a resultados erróneos por sobreestimación en muchos estudios.



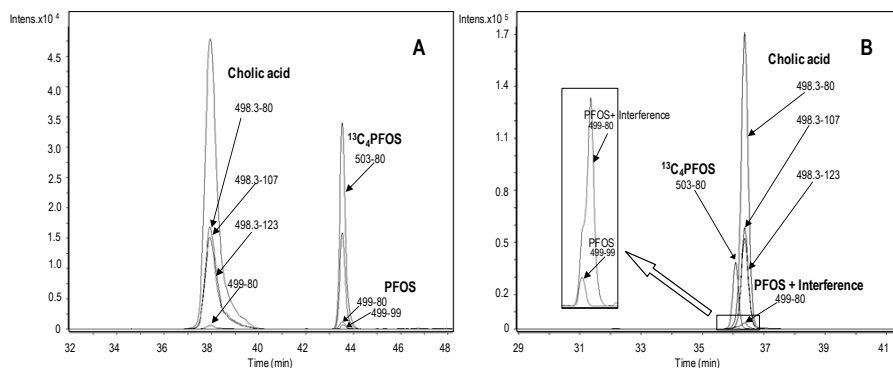
**Figura 8.4.b** Estructura, masa molecular y transiciones en EM de las biliares de taurodeoxicolato y PFOS

En nuestras investigaciones comprobamos la co-elución de sales biliares con PFOS cuando se analizaron muestras de origen animal con una columna estándar  $C_{18}$  y la correspondiente sobreestimación al usar la

<sup>215</sup>K. Kannan, J.C. Franson, W.W. Bowerman, K.J. Hansen, J.D. Jones, J.P. Giesy, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3065.

<sup>216</sup>J.P. Benskin, M. Bataineh, J.W. Martin, Anal Chem. 79 (2007) 6455.

transición 499-80. El uso de la columna perfluorada permitió separar estas interferencias del analito cromatográficamente (ver figura 8.4.c) y obtener así resultados exactos con la transición más sensible de PFOS.



**Figura 8.4.c** Cromatogramas CL/QQQ ( $MS^2$ ) correspondientes a la ventana de elución de PFOS y ácido cólico, mostrando las principales transiciones de PFOS, su estándar interno ( $^{13}C_4$  PFOS) y la interferencia, usando una columna perfluoro- $C_8$  (A) o  $C_{18}$  (B) en el análisis de una muestra de arenque.

### 8.5. Características analíticas del método

Los límites de detección y cuantificación del método se estimaron utilizando extractos de diversas muestras blanco (zanahoria, naranja, carne de cerdo, pan y aceite de girasol) con una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente.

En la Tabla 8.5.a se muestran las características analíticas del método. Los LQs obtenidos fueron de 1-5 pg/g a excepción de los PFCs de cadena  $C_4$  y  $C_5$  (25-30 pg/g), debido a un LQ instrumental más alto y son los más bajos entre los métodos ya publicados. La precisión analítica, estuvo entre el 4 y el 12%. Las recuperaciones variaron entre el 60 y el 120% (ver Figura 8.5.a).

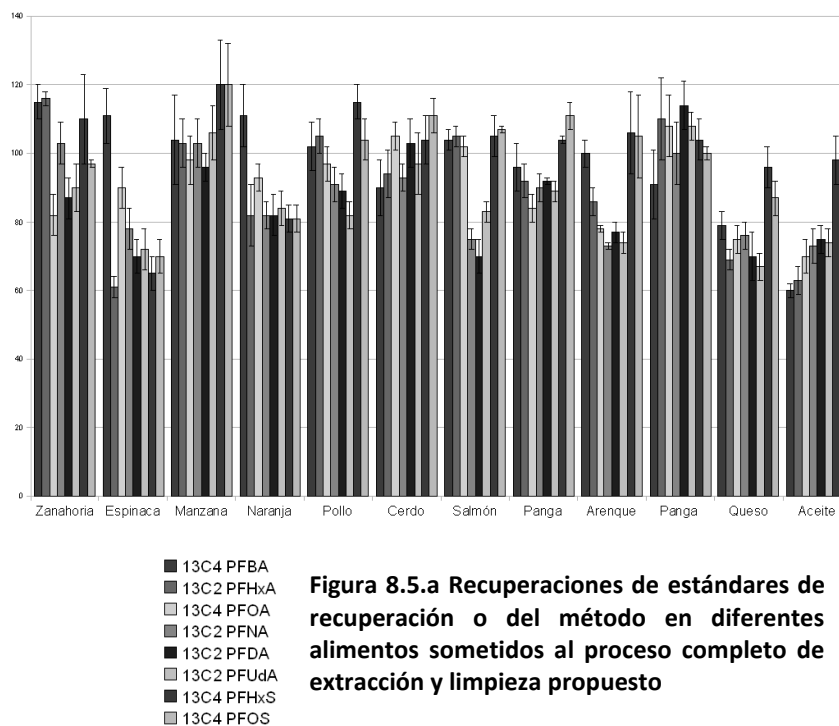


Tabla 8.5.a Características analíticas del método				
PFCs	Rango de calibración (ng mL <sup>-1</sup> )	Tiempo de retención (min)	LQ del método (pg g <sup>-1</sup> )	<sup>b</sup> LD del método (pg g <sup>-1</sup> )
PFBA	0.7–20	14.4	60	30
PFPeA	0.7–20	25.7	60	30
PFBS	0.7–20	25.0	50	25
PFHxA	0.05–30	33.1	15	5
PFHpA	0.05–20	38.7	15	5
PFHxS	0.5–20	36.6	25	10
PFOA	0.15–20	42.8	10	5
PFNA	0.05–20	45.8	5	3
PFOS	0.05–20	43.8	3.5	2
PFDA	0.05–20	47.8	5	3
PFUdA	0.15–20	49.2	10	5
PFDoA	0.025–20	50.4	2.5	1
PFTTrA	0.025–20	51.6	2.5	1
PFTeA	0.025–20	52.8	2.5	1

## 8.6. Análisis de alimentos

El método propuesto se aplicó al análisis (por duplicado) de un total de 12 muestras de pescado (arenque, panga, salmón), carne (cerdo y pollo), pan, hortalizas (espinacas y zanahoria), frutas (naranja y manzana), queso (*Gouda*) y aceite de girasol.

Sólo se encontraron tres muestras contaminadas (salmón, arenque y espinacas). De los sulfonatos sólo se halló el PFOS ( $57 \pm 5$  pg/g en arenque y  $16 \pm 1$  pg/g en salmón) y el PFHxS (<LOQ) en la muestra de espinacas, tal y como se muestra en la tabla 8.6.a

<b>Tabla 8.6.a Concentraciones de PFCs halladas (n=2) en las muestras contaminadas</b>			
<b>PFCs</b>	<b>Arenque</b>	<b>Salmón</b>	<b>Espinacas</b>
PFBA	nd	Nd	nd
PFPeA	nd	nd	nd
PFHA	nd	nd	nd
PFHpA	nd	nd	8.8±0.4
PFOA	27±2	nd	31±2
PFNA	7.7±0.5	5.6±0.6	nd
PFDA	<LOQ	10.3±0.7	<LOQ
PFUdA	31±3	75±5	nd
PFDoA	11.3±0.5	16±1	nd
PFTTrDA	27±6	31±3	nd
PFTeDA	nd	4.5±0.6	nd
PFBS	nd	nd	nd
PFHxS	nd	nd	<LOQ
PFOS	57±5	16±1	nd

Se hallaron ácidos de cadena larga en pescado, lo cual confirma la bioacumulación de estos compuestos tal como se ha recogido en

bibliografía<sup>217</sup> y la necesidad de métodos eficientes para la determinación de ácidos con cadenas C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>.

La contaminación por PFCs en pescado es conocida al actuar los océanos como sumideros de contaminantes y ha sido ampliamente estudiada, en el caso de los vegetales es menos conocida, aunque la migración desde el envase plástico, la contaminación durante el procesamiento o la transferencia a las cosechas desde el suelo del cultivo son posibles fuentes. Las bajas concentraciones halladas están en concordancia con otros resultados ya publicados<sup>218,219</sup>.

## **9. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES PROGRAMABLES BASADOS EN AGREGADOS INVERSOS DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS. CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL COMO MATERIALES DE ACCESO RESTRINGIDO Y EXTRACTANTES MIXTOS**

---

En las investigaciones que se recogen en esta Memoria se han desarrollado disolventes supramoleculares constituidos por agregados de alcoholes alifáticos cuyo tamaño y composición pueden programarse en función de las condiciones ambientales (porcentaje de THF y agua) donde se produce el autoensamblaje de las moléculas anfífilas. Estas propiedades han permitido el desarrollo de extracciones con disolventes que ofrecen mecanismos mixtos de extracción, basadas en la interacción con los solutos a través de puentes de hidrógeno y fuerzas dispersivas, y disolventes, que por vez primera, actúan como materiales de acceso restringido que proporcionan selectividad para la extracción de contaminantes de distinto tamaño y para la

---

<sup>217</sup>Conder, J.M.; Hoke, R.A.; Wolf, W.; Russell, M.H.; Buck, R.C., *Environ. Sci. Technol.*, 42 (2008)995.

<sup>218</sup>FSA (Food Standard Agency), 2006. Fluorinated chemicals: UK dietary intakes. Food Survey Information Sheet 11/06, London, UK.

<sup>219</sup> Ericson, I.; Martí-Cid, R.; Nadal, M.; Van Bavel, B.; Lindström, G.; Domingo, J.L. *J. Agric. Food. Chem.* 56 (2008) 1787.

exclusión de macromoléculas en muestras ambientales, biológicas o alimentos (p. ej. proteínas, polisacáridos o ácidos húmicos).

Por último, gracias al grupo alcohol del anfifilo, estos SUPRAS ofrecen otras ventajas concretas para su uso en procesos de extracción, como son un amplio intervalo de pH ( $pK_a \sim 15$ ), lo cual nos permite llevar a cabo etapas de re-extracción a medio acuoso en el caso de compuestos ionizables con el fin de eliminar el tensioactivo y hacerlo compatible con electroforesis capilar, y una baja señal de absorbancia y fluorescencia en comparación con otros tensioactivos comunes, lo cual facilita la compatibilidad con este tipo de detectores.

### **9.1. Volumen y composición de los SUPRAS**

Para predecir la composición del disolvente en unas condiciones experimentales dadas se definieron ecuaciones para calcular la concentración de los tres componentes que lo forman (alcohol, THF y agua) en base a los datos experimentales. La composición del disolvente fue constante en un intervalo de alcohol de hasta el  $\sim 5\%$  w/w en la disolución en la que se produjo el autoensamblaje y varió en un amplio intervalo con la relación THF:agua. Así, el incremento de la relación THF:agua provocó un aumento exponencial del volumen de disolvente generado y una disminución de la concentración de anfifilo en el mismo.

Como se observa en la Tabla 9.1.a, la variable longitud de cadena del anfifilo sólo fue significativa en el cálculo del contenido de agua del SUPRAS. Mediante la ecuación de volumen se pueden conocer a priori los factores de concentración máximos bajo las distintas condiciones experimentales fijadas, facilitando así los procesos de optimización.

La definición de la composición del SUPRAS nos permite además prepararlos por mezcla directa de sus componentes, lo cual es una buena opción en aquellas aplicaciones que no requieran una separación de fases (como extracciones de muestras sólidas) para el ahorro de reactivos.

<b>Tabla 9.1.a Ecuaciones predictivas para el volumen y composición de SUPRAS de agregados inversos de alcoholes alifáticos generado bajo distintas relaciones THF:agua (w/w) y alcoholes de distinta longitud de cadena (C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>)</b>			
<b>Variable dependiente (y)</b>	<b>Ecuación</b>	<b>Modelo de regresión</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>
<b>Agua (% w/w) en SUPRAS</b>	$Y_{ws}: 42.2 \pm 1.5 - 0.31 \pm 0.01 X_{wb} - 0.998 \pm 0.091 Z$	Lineal múltiple	0.9729
<b>THF (% w/w) en SUPRAS</b>	$Y_{ts} = 6.3 \pm 0.2 + 2.4 \pm 0.1 X_{tb} - 0.024 \pm 0.002 X_{tb}^2$	Polinomial de segundo grado	0.9851
<b>Volumen SUPRAS (μL)</b>	$Y = X [0.17 \pm 0.02 + e^{[0.0389 \pm 0.0003Z]}]$	No lineal	0.986

Y<sub>w</sub>: agua (% w/w) en SUPRAS; X<sub>wb</sub>: agua (% w/w) en la disolución madre; Z: número de átomos de carbono en la cadena alifática del alcohol; Y<sub>ts</sub>: THF (% w/w) en SUPRAS; X<sub>tb</sub>: THF (% w/w) en la disolución madre; Y: volumen de SUPRAS (μL); X: cantidad de alcohol (mg); Z: THF (% v/v) en disolución la madre

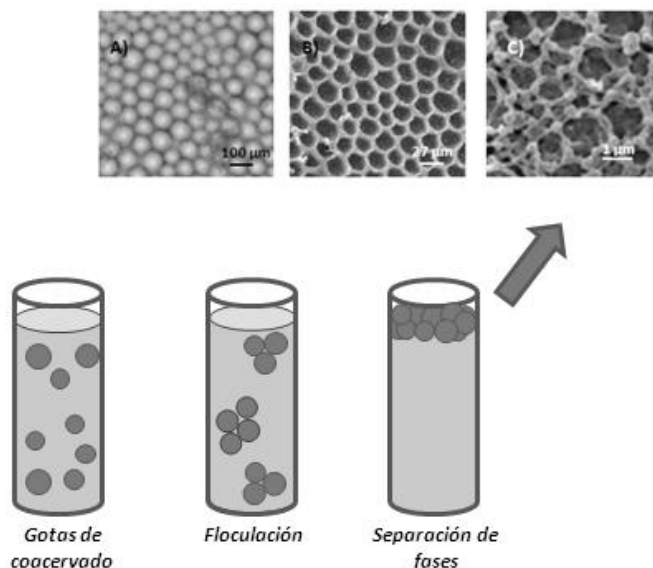
## 9.2. Microestructura de los SUPRAS

Las técnicas microscópicas son actualmente imprescindibles para la elucidación de la estructura de muchos materiales a escala micro y nano. Debido a que los agregados en el SUPRAS se generan a través de procesos de autoensamblaje reversibles, la estabilidad de los mismos depende de las condiciones del medio en el que se encuentran y por tanto, los procesos de preparación de muestra implicados en las técnicas microscópicas pueden producir alteraciones. En este sentido, las técnicas de microscopía óptica y electrónica criogénica de barrido (Cryo-SEM) resultaron ser las más adecuadas para estudiar, de forma aproximada, el tipo y tamaño de los agregados en los SUPRASs.

En base a las observaciones realizadas, que muestran el SUPRAS como un continuo de microgotas de coacervado (ver Figura 9.2.a) el proceso de formación del SUPRAS se propone como un proceso secuencial que implica las etapas de a) formación de los agregados inversos en la disolución madre que se agregan dando lugar a “gotas de coacervado”, b) floculación de las



gotas dando lugar a clústeres de mayor tamaño y c) separación de estas gotas de menor densidad en una nueva fase dando lugar al disolvente supramolecular. Este proceso de *creaming* es muy común en procesos de coacervación y formación de microemulsiones.



**Figura 9.2.a** Proceso de auto-ensamblaje en la formación del SUPRAS de agregados inversos de alcoholes alifáticos y microestructuras generadas tras la separación de fases: gotas de coacervado observadas con microscopía óptica (A) y Cryo-SEM (B) y estructura interna de las gotas con cryo-SEM (C)

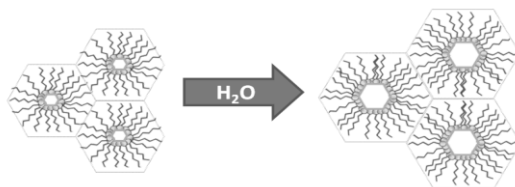
Respecto a la agregación de los alcoholes de cadena larga en mezclas THF:agua se propone el agua como agente director del auto-ensamblaje, ya que en THF puro sólo se ha descrito la formación de dímeros o tetrámeros. El agua (siempre en menor cantidad en el SUPRAS que el THF, ~5-20% w/w) debe instalarse en el *core* de los agregados inversos, siendo el THF la fase continua en la que se dispersan. Así, la relación molar agua/alcohol en el SUPRAS (~0.5-15) es propia de agregados inversos

La microestructura del SUPRAS se define como un conglomerado de gotas de coacervado con forma hexagonal o *honeycomb*, que adoptan esta conformación debido probablemente a la alta densidad de empaquetamiento de las mismas (Figura 9.2.a A y B). Las gotas presentan tamaños homogéneos que varían de  $\sim 1$ -200  $\mu\text{m}$  en función de las condiciones de formación). El tamaño de la gota de coacervado fue dependiente de la relación THF:agua en la disolución madre como puede verse en la tabla 9.2.a y es por lo tanto “programable” y reversible en función de el ambiente de formación, pudiendo disponer así de “materiales adaptativos”. Es la primera vez que se describe este tipo de microestructura para un SUPRAS.

<b>Tabla 9.2.a Tamaño de la gota de coacervado en el SUPRAS de agregados inversos de alcoholes alifáticos en función de la composición de la disolución madre</b>	
<b><sup>a</sup>THF (v/v) en la disolución madre</b>	<b>Tamaño de la gota de coacervado después de la separación de fases</b>
10	1-5 $\mu\text{m}$
20	5-20 $\mu\text{m}$
30	20-40 $\mu\text{m}$
40	40-60 $\mu\text{m}$
50	60-100 $\mu\text{m}$
60	100-200 $\mu\text{m}$

Las imágenes obtenidas por cryo-SEM a menor escala muestran una estructura interna de las gotas consistente en una red de agregados hexagonales inversos de menor tamaño ( $\sim 0.5$ -10  $\mu\text{m}$ ), tal como puede apreciarse en la Figura 9.2.a . Debido a la labilidad de los agregados al operar con cryo-SEM, no se pudo establecer con precisión el tamaño del *core* de los mismos bajo diferentes relaciones THF:agua de formación. No obstante, debido a que las relaciones molares agua:alcohol aumentaron al disminuir el contenido en agua de la disolución madre, se espera, que al igual que ocurre con el aumento del tamaño de las gotas de coacervado, aumente también el

tamaño del agregado inverso al aumentar el *pool* acuoso en el *core* (ver figura 9.2.b)



**Figura 9.2.b. Representación del incremento del tamaño de los agregados hexagonales inversos (estructura propuesta para el SUPRAS) por aumento del *pool* acuoso del *core***

Por otro lado, la relación molar THF:alcohol en el SUPRAS aumentó al hacerlo el tamaño del agregado y la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol, confirmando la hipótesis de que el THF es el medio continuo en el que se dispersan los agregados.

### ***9.3. Evaluación del SUPRAS como material de acceso restringido en la extracción de compuestos polares y clean-up de macromoléculas***

Para evaluar la influencia del tamaño de los agregados en el SUPRAS en la selectividad de la extracción se seleccionaron una serie de contaminantes polares de diferente peso molecular y una variedad de macromoléculas (ver Tabla 9.3.a). Los contaminantes seleccionados fueron ocratoxina A (OTA), que se extrajo de muestras de alimento para bebé de tipo cereal y los colorantes acid red 97 y brilliant blue G, que se extrajeron de una muestra de lodo de depuradora.

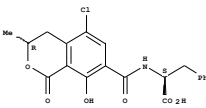
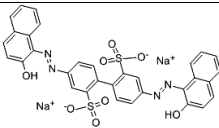
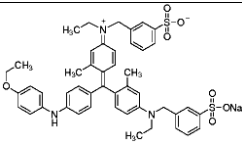
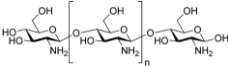
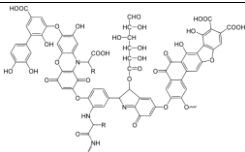
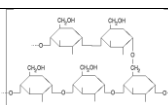
Como se muestra en Tabla 9.3.a las recuperaciones fueron muy dependientes de la relación molar agua/decanol y, por tanto, de la microestructura o tamaño de los agregados que aumentaron al aumentar esta

relación, facilitando la difusión de los compuestos polares al *core* de los mismos. Es significativo resaltar que estos contaminantes no se extrajeron de las matrices ensayadas al emplear disoluciones de decanol en THF a concentraciones similares a las encontradas en el SUPRAS, poniéndose de manifiesto la importancia de la presencia de agregados con regiones de distinta polaridad para la extracción de estos compuestos polares.

En el caso de las macromoléculas, sólo se observó una ligera extracción para los ácidos húmicos al usar un SUPRAS con la mayor relación agua/decanol ensayada y, por tanto, mayor tamaño de agregado. Estos resultados confirman la importancia del tamaño de las vacuolas y la posibilidad de utilizar los SUPRAS como materiales de acceso restringido para evitar la co-extracción de macromoléculas.

Por otro lado se evaluó la extracción de diferentes proteínas en disolución acuosa con SUPRAS (albúminas y gluten). En todos los casos precipitaron y quedaron aglutinadas bajo el SUPRAS tras una etapa de centrifugación, debido tanto a la presencia de THF, que origina la desnaturalización, como del alcohol, que provoca la floculación de las mismas.

**Tabla 9.3.a Compuestos seleccionados para evaluar las propiedades del SUPRAS como material de acceso restringido: peso molecular, estructura, tipo de compuesto y rendimientos de extracción con SUPRAS de creciente tamaño de agregado**

	MW	Estructura		Solubilidad en el SUPRAS		
<b>OTA</b>	403.8		Micotoxina	THF (v/v)	H <sub>2</sub> O/C10 M/M	<sup>a</sup> R (%)
				bulk SUPRAS		
				<sup>b</sup> 10	0.5	23±5
				<sup>b</sup> 20	1.2	45±9
				<sup>c</sup> 30	2.6	80±1
				<sup>c</sup> 50	7.7	109±4
<b>Acid red 97</b>	698.6		Colorante	THF (v/v)	H <sub>2</sub> O/C10 M/M	<sup>a</sup> R (%)
				bulk SUPRAS		
				<sup>b</sup> 10	0.5	-
				<sup>b</sup> 20	1.2	18±3
				<sup>c</sup> 30	2.6	36±1
				<sup>c</sup> 50	7.7	100±1
<b>Brilliant blue G</b>	825.9		Colorante	THF (v/v)	H <sub>2</sub> O/C10 M/M	<sup>a</sup> R (%)
				bulk SUPRAS		
				<sup>b</sup> 10	0.5	-
				<sup>b</sup> 20	1.2	-
				<sup>c</sup> 30	2.6	50±3
				<sup>c</sup> 50	7.7	54±1
<b>Quitosán</b>	50.000-190.000		Polisacárido estructural	No se extrae en ningún caso		
<b>Ácidos húmicos</b>	2,000-500.000		Mezcla compleja de ácidos procedentes de la degradación de la materia orgánica del suelo	Sólo se extrae ligeramente (resultados cualitativos) con altos porcentajes de THF (50% v/v)		
<b>Almidón</b>	-		Polisacárido de reserva vegetal	No se extrae en ningún caso		

<sup>a</sup>Recuperación, n=3; SUPRASs hechos a partir de <sup>b</sup>300 o <sup>c</sup>200 mg de decanol y 10mL de THF:agua; Muestra: 400 mg de alimento de bebé y 300 mg de lodo

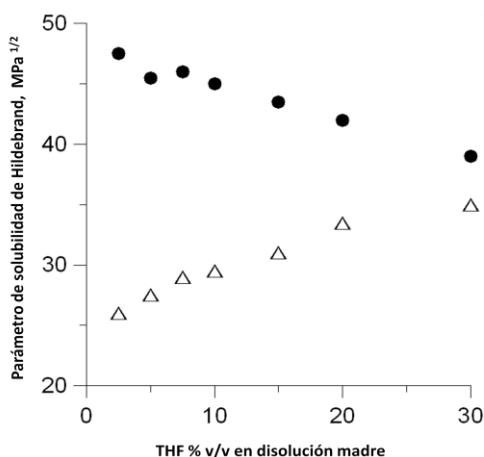
#### **9.4. Evaluación del SUPRAS como extractante mixto de compuestos apolares y de mediana polaridad**

Los SUPRAS de agregados inversos de alcoholes de cadena larga en mezclas THF:agua proporcionan puentes de hidrógeno e interacciones dispersivas como fuerzas directoras de las extracción. Con el fin de evaluar su aplicabilidad a la extracción de compuestos apolares o de mediana polaridad en muestras acuosas ambientales, se seleccionó un grupo de clorofenoles cancerígenos, Los contaminantes estudiados fueron 2,4-diclorofenol (2,4-TCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP), 2,4,5-triclorofenol (2,4,5-TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TTCP) y pentaclorofenol (PCP). Esta selección se hizo en base la posibilidad de establecer tanto interacciones hidrófobas como puentes de hidrógeno para su extracción, el amplio rango de polaridad ( $\log K_{ow}$  2.9-4.8) que poseen y la necesidad de desarrollar métodos rápidos para su determinación a los bajos límites legislativos establecidos en relación a estándares de calidad del agua ( $0.4-1 \mu\text{g L}^{-1}$  para PCP según la Directiva 2008/105/EC). La selección de muestras líquidas permitió estudiar los factores de concentración alcanzados que se pueden alcanzar con el SUPRAS descrito así como la distribución de los analitos entre el disolvente y la disolución de equilibrio. El SUPRAS fue formado in situ, es decir, añadiendo directamente el alcohol y el THF a la muestra acuosa.

En la siguiente tabla se muestran las variables optimizadas en el estudio y los valores seleccionados para el método en base a las recuperaciones y factores de concentración, tal y como se especificó en el apartado 5.2. de este bloque de la Tesis.

<b>Tabla 9.4.a. Variables experimentales ensayadas en la optimización del método con SUPRAS para la determinación de clorofenoles cancerígenos en muestras de aguas ambientales</b>		
<b>Variable</b>	<b>Intervalo estudiado</b>	<b>Valor óptimo</b>
Longitud de cadena del alcohol	C <sub>7</sub> -C <sub>14</sub>	C <sub>10</sub>
Composición del SUPRAS	Generado a partir de 2.5-30 (%v/v) THF en disolución madre	7.5 (% v/v)
Volumen de SUPRAS	61-1209 µL	151 µL
Tiempo de agitación	1-30 min	3 min
Temperatura	25-50 °C	Temperatura ambiente (variable sin influencia)
Fuerza iónica	0.01-1 M NaCl	Sin ajustar (variable sin influencia)

Respecto a la longitud de cadena del alcohol, tanto decanol como dodecanol proporcionaron los mayores rendimientos (88-98%) frente a 51-60% para C<sub>7</sub> y 69-81% para C<sub>14</sub> bajo las mismas condiciones experimentales de formación (100 mg de alcohol y 7.5-12.5 % v/v de THF en la disolución madre). Estos resultados se pueden interpretar en base a las fuerza de las interacciones implicadas en la extracción (puentes de hidrógeno y fuerzas de dispersión) que aumentan y disminuyen, respectivamente, con la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol. De este modo, los alcoholes C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> representan un compromiso entre ambas fuerzas. Es de esperar que analitos con polaridad en el mismo intervalo que los ensayados (log Kow 2.9-4.8) se comporten de igual modo. Por otro lado, se comprobó que compuestos de menor polaridad, en concreto fenol (log Kow 1.5), se extraen mejor con alcoholes de longitudes de cadena más corta, los cuales son mejores donadores de protones y por tanto el establecimiento de puentes de hidrógeno en la extracción tiene más peso, además de proporcionar *pools* de agua en los agregados de mayor tamaño (ver ecuación para el cálculo de contenido en agua en el SUPRAS en la tabla 9.3.a) Así, las recuperaciones para fenol fueron de 70±4% con C<sub>7</sub>, 35±2% con C<sub>10</sub> y 22±3% con C<sub>14</sub>.



**Figura 9.4.a. Representación del parámetro de solubilidad de Hildebrand en el SUPRAS (●) y en la disolución de equilibrio (△)**

Como ya se ha comentado anteriormente en esta Tesis, el parámetro de solubilidad de Hildebrand indica la solvencia relativa de un disolvente y se corresponde con las fuerzas totales de van der Waals resultantes del efecto aditivo de las fuerzas de dispersión, fuerzas polares y puentes de hidrógeno. Este parámetro es cada vez más parecido en la fase SUPRAS y la disolución de equilibrio al aumentar la cantidad de THF en la disolución madre, llegando a ser muy similar al 30% v/v de THF (ver figura 9.4.a). Al optimizar la variable % v/v THF en la disolución madre para formar el SUPRAS, se obtuvieron rendimientos máximos (88-104%) entre el 7.5-15%, los cuales disminuyeron significativamente al 30% v/v de THF (39-63%), debido probablemente a esta similitud de solvencia entre las dos fases. Para favorecer el equilibrio de partición hacia el SUPRAS en muestras líquidas se recomienda por tanto trabajar a bajos porcentajes de formación de THF. Otra razón para trabajar en este intervalo es que según la ecuación para la predicción del volumen en la tabla 9.1.a., el volumen de SUPRAS aumenta de



forma exponencial con la concentración de THF en la disolución de equilibrio y disminuyen, por tanto, los factores de concentración.

Por otro lado, la principal fuerza extractiva son las interacciones de dispersión, ya que entre las tres componentes del parámetro de solubilidad de Hildebrand, estas son siempre mayores en el SUPRAS ( $\delta_d = 16.95-16.7 \text{ MPa}^{1/2}$ ), que en la disolución en equilibrio ( $\delta_d = 15.7-15.8 \text{ MPa}^{1/2}$ ), mientras que la componente puentes de hidrógeno son mayores en el equilibrio [ $\delta_{h(\text{SUPRAS})} = 19.7-22.9 \text{ MPa}^{1/2}$ ,  $\delta_{h(\text{equilibrium solution})} = 39.7-37.1 \text{ MPa}^{1/2}$ ]. Esta hipótesis se confirma con la dependencia de las recuperaciones con el pH. Así a pH 9 la recuperación de los clorofenoles total o parcialmente ionizados disminuye drásticamente [ $47 \pm 1$ ,  $8.51 \pm 0.01$ ,  $41.9 \pm 0.4$ ,  $2.7 \pm 0.2$  and  $14.3 \pm 0.3\%$  para 2,4-DCP (pKa 8.1), 2,4,6-TCP (pKa 6.6) 2,4,5-TCP (pKa 7.1), 2,3,4,6-TCP (pKa 5.6) y PCP (pKa 4.7), respectivamente]. Los valores de las demás variables optimizadas se muestran en tabla 9.4.a.

En la siguiente tabla se muestran las características analíticas del método propuesto para la determinación de clorofenoles en aguas ambientales. Los límites de cuantificación del método ( $0.24-0.21 \mu\text{g L}^{-1}$ ) son los suficientemente bajos para cumplir con los límites legislados en aguas ambientales ( $0.4-1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Para comprobar su aplicabilidad se analizaron dos muestras de río, una de pantano y dos de agua de mar (procedentes de diferentes puntos en Córdoba y Málaga) y fortificadas a distintos niveles en el intervalo  $0.5-5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Las recuperaciones estuvieron entre el 84 y el 99% con desviaciones estándar en el intervalo 1-7%. No se encontró contaminación por clorofenoles ni interferentes de la matriz en ninguna de las muestras analizadas.

<i>Tiempo retención (min)</i>		<i>Calibración</i>			<i>LQ método <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></i>
		<sup>a</sup> Intervalo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pendiente $\pm$ SD ( $\text{mV L mg}^{-1}$ )	<sup>b</sup> $r$	0.21
<b>2,4-DCP</b>	10.6	50-2000	13380 $\pm$ 167	0.9994	0.22
<b>2,4,6-TCP</b>	13.8	50-2000	12407 $\pm$ 179	0.9992	0.21
<b>2,4,5-TCP</b>	14.2	50-2000	12690 $\pm$ 137	0.9992	0.22
<b>2,4,5,6-TTCP</b>	16.6	50-2000	10181 $\pm$ 115	0.9995	0.21
<b>PCP</b>	19.1	50-2000	8957 $\pm$ 147	0.9998	0.24

LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación; <sup>a</sup>el punto más bajo de la recta de calibrado se corresponde con el LQ instrumental; <sup>b</sup>coeficiente de correlación;  $n=7$

Los resultados del estudio de la microestructura y composición de este nuevo SUPRAS de agregados inversos de alcoholes en muestras THF:agua, como un material adaptativo (dependiente del medio de formación), reversible y programable, así como el estudio de las interacciones de solubilidad que gobiernan los procesos de extracción y de las propiedades ventajosas que proporcionan como materiales de acceso restringido, son de gran importancia en el área de las extracciones analíticas ampliando su aplicabilidad y dan luz en la definición y control de este nuevo tipo de disolventes, generados por procesos espontáneos de auto-ensamblaje, que son aún poco conocidos.

## **10. ADSORBENTES HEMIMICELARES FORMADOS POR ALQUILCARBOXILATOS QUIMIADSORBIDOS SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

---

### ***10.1. Metodología de extracción***

El procedimiento propuesto para la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos cancerígenos (CPAHs) con el nanomaterial C<sub>14</sub>-MNPs (hemimicelas de tetradecanoato sobre nanopartículas de magnetita) fue el siguiente (figura 10.1.a):

1. Extracción de la muestra con C<sub>14</sub>-MNPs en un recipiente de vidrio cónico usando un agitador de varilla.
2. Retirada del nanomaterial con un imán de Fe-Nd-B y desecho de la muestra por decantación.
3. Eliminación del agua que impregna las nanopartículas con una corriente de N<sub>2</sub>.
4. Elución de CPAHs con la mezcla del eluyente-THF:ACN 50:50. La forma cónica del recipiente facilita esta etapa.
5. Retirada del nanomaterial de la disolución orgánica con ayuda del imán y filtración con jeringa (0.22 µm, Nylon).
6. Inyección (6 µL) y análisis mediante cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica.

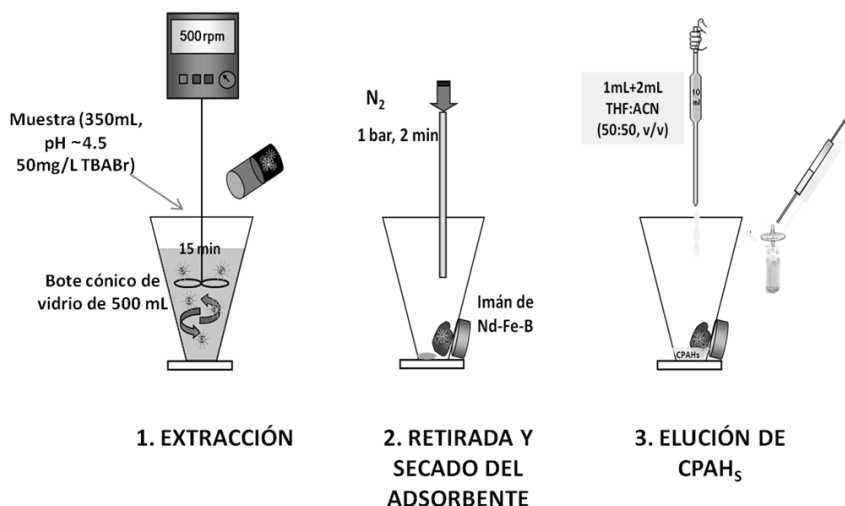


Figura 10.1.a Procedimiento de extracción de CPAHs con C<sub>14</sub>-MNPs

## 10.2. Síntesis y propiedades del nanomaterial

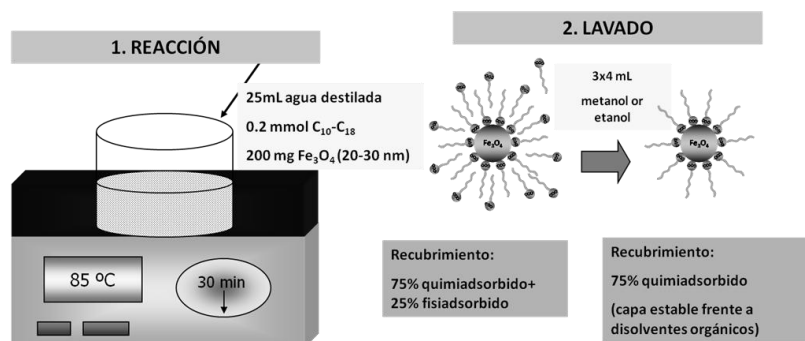
Los alquilcarboxilatos reaccionan rápidamente con la magnetita a altas temperaturas dando lugar a monocapas de tensioactivo quimiadsorbido sobre la superficie del óxido mineral mediante la formación de quelatos entre el grupo carboxilato y el átomo de hierro (ver figura 10.2.a). El exceso de tensioactivo, que queda como una segunda capa se elimina mediante lavado con disolvente orgánico.



Figura 10.2.a. Representación esquemática del quelato bidentado formado entre átomos de Fe y oleato

En la Figura 10.2.b se muestra el procedimiento seguido para la síntesis de las MNPs. Se utilizó magnetita disponible comercialmente y se descartó el estudio de alquilcarboxilatos insaturados (como oleato), ya que aunque se han usado ampliamente para la preparación de ferrofluidos, proporcionan una menor densidad de empaquetamiento teórica que los

saturados ( $36\text{-}38 \text{ \AA}^2$  /molécula para oleato frente a  $20\text{-}22 \text{ \AA}^2$  /molécula para  $C_{10}\text{-}C_{14}$  saturados en nanopartículas de 7 nm de diámetro<sup>220,221</sup>.)



**Figura 10.2.b. Esquema de la optimización de la síntesis del nanomaterial**

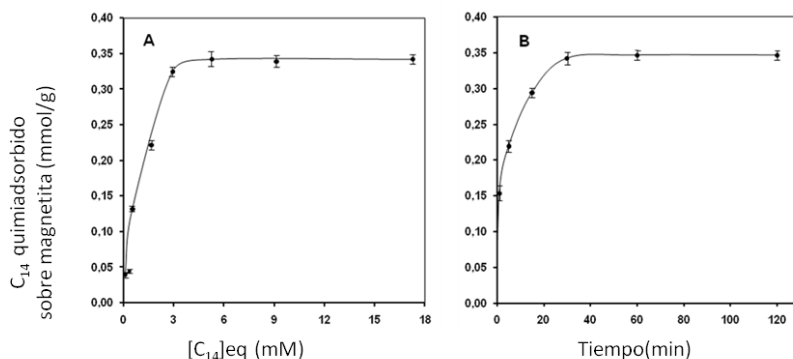
En la Figura 10.2.c se muestra como ejemplo la isoterma de adsorción obtenida para  $C_{14}$ , así como el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. La saturación se alcanzó a un valor aproximado de 5mM, lo que supone un valor de 0.35 mmol de alquilcarboxilato por gramo de magnetita. Se seleccionó un valor de 1 mmol/g como óptimo. El equilibrio de reacción se alcanzó a aproximadamente 25-30 min (85 °C).

El área ocupada por cada molécula de tensioactivo está comprendida entre  $28$  y  $30 \text{ \AA}^2$  lo que implica una elevada densidad de empaquetamiento. Este empaquetamiento es menor que el recogido en bibliografía para nanopartículas de  $\sim 7$  nm de diámetro ( $\sim 25\%$  menor) y se debe a que se produce una disminución de la densidad de empaquetamiento con el aumento del tamaño de la nanopartícula<sup>222</sup>.

<sup>220</sup> L. Shen, A. Stachowiak, Langmuir, 15 (1999) 447.

<sup>221</sup> A. Wooding, M. Kilner, D.B. Lambrick, J. Colloid Interface Sci., 141 (1991) 236.

<sup>222</sup> L. Zhang, R. Ge, H-C. Gu, Appl. Surf. Sci. 253 (2006) 2611.

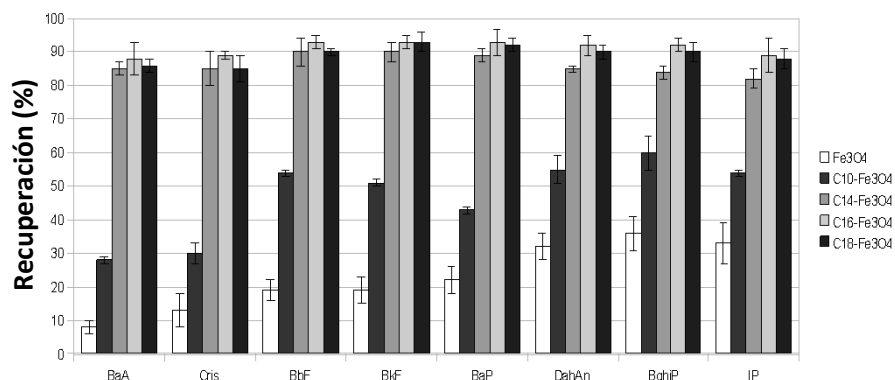


**Figura 10.2.c. Isotherma de adsorción de alquilcarboxilato sobre magnetita (20-30 nm diámetro)**

En la figura 10.2.d se muestra la capacidad de extracción de diferentes adsorbentes para CPAHs en aguas. Como puede observarse, se requirieron carboxilatos con cadena alquílica de 14 o más átomos de carbono para conseguir rendimientos de extracción satisfactorios (>75%).

Para explicar este comportamiento hay que considerar que la formación de una monocapa de tensoactivo quimiadsorbida sobre la superficie de la magnetita ha sido explicada sobre la base del modelo de doble capa eléctrica, según el cual los aniones carboxilato estarían localizados en el plano interno de Helmholtz, quedando cuatro grupos metileno sumergidos en la doble capa y no estando por tanto disponibles para interactuar con el medio<sup>223</sup>. De este modo, una cadena de 10 átomos de carbono equivaldría a una de 6 y la adsorción de CPAHs podría verse limitada por las menores interacciones hidrófobas o impedimentos estéricos, teniendo en cuenta la alta hidrofobicidad ( $\log K_{ow}=5.9-7.1$ ) y tamaño (4-7 anillos bencénicos) de estos compuestos.

<sup>223</sup> S.E. Khalafalla, G. W. Reimers, IEEE Trans. Magn. (1980) MAG-16, 178-183.



**Figura 10.2.d. Recuperaciones de CPAHs (300 mL muestra, 6 ng CPAHs) obtenidos con 200 mg nanomagnetita pura o recubierta con alquil carboxilatos (C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>)**

Con el volumen de muestra seleccionado (350 mL), se alcanzó un factor de preconcentración de 100 y LQs de  $\sim 0.5$  ng/L, límites suficientemente bajos para cuantificar los CPAHs a los niveles requeridos por la legislación. El pH y la fuerza iónica no afectaron a los rendimientos de la extracción, lo cual pone de manifiesto la robustez del método. El ácido carboxílico no se eluye con los analitos proporcionando extractos limpios para el posterior análisis cromatográfico de los componentes de interés.

### **10.3. Características analíticas del método**

En la tabla 10.3.a se muestran las características analíticas del método para cada uno de los CPAHs analizados.

**Tabla 10.3.a Características analíticas del método basado en el adsorbente de  $C_{14}-Fe_3O_4$** 

CPAH	Tiempo retención	Rango de calibración ( $\mu\text{g/L}$ )	LQs ( $\text{ng/L}$ )	LDs ( $\text{ng/L}$ )
BaA	5.1	0.025–10	0.25	0.15
Chry	5.7	0.04–10	0.4	0.25
BbF	8.3	0.04–10	0.4	0.25
BkF	9.9	0.020–10	0.2	0.1
BaP	11.9	0.020–10	0.2	0.1
DahA	15.9	0.04–10	0.4	0.25
BghiP	17.8	0.04–10	0.4	0.25
IP	19.6	0.05–10	0.5	0.25

#### 10.4. Análisis de muestras reales

Se analizaron un total de tres muestras de río, una de pozo, dos de agua de mar y una de pantano para comprobar la aplicabilidad del método. Se determinó tanto la concentración de CPAHS presente como las recuperaciones halladas tras fortificar a varios niveles (1-10  $\text{ng/L}$ ). Las recuperaciones estuvieron siempre entre el 85 y el 94%.

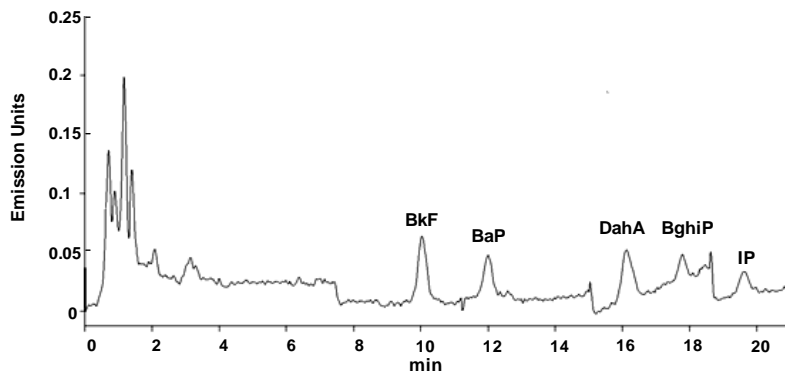
Sólo se encontró contaminación por PAHs en la muestra del pantano de Navallana, concretamente de BkF, BaP, DahA, BghiP e IP, todos a concentraciones por debajo de los límites legislados (0.42–0.96  $\text{ng L}^{-1}$ ). En la Figura 10.4.a se muestra el cromatograma correspondiente a esta muestra.

Mediante el desarrollo de este tipo de adsorbentes es posible la utilización de hemimicelas en un intervalo amplio de pH, con extractos libres de tensioactivo y utilizando procedimientos de extracción simples y rápidos, ya que las partículas se pueden recuperar con un simple imán.

Las hemimicelas de alquilcarboxilatos proporcionan interacciones exclusivamente hidrófobas, ya que los grupos polares coordinados al hierro no se encuentran disponibles para la extracción. El desarrollo de nuevos adsorbentes supramoleculares basados en esta estrategia de síntesis a través de anfífilos bipolares, que proporcionen interacciones polares además de



hidrófobas, constituye actualmente una de las líneas de investigación del grupo.



**Figura 10.4.a. Cromatograma de CL-FL correspondiente al análisis de CPaHS en el pantano de Navallana**

## CONCLUSIONES

Las investigaciones que se recogen en la Memoria de esta Tesis Doctoral han permitido profundizar en aspectos básicos de la formación, composición y estructura de los disolventes supramoleculares de agregados inversos de ácidos carboxílicos y han extendido su campo de aplicación en ámbitos y matrices hasta ahora inexplorados. El conocimiento de los mecanismos de formación de estos agregados en mezclas de THF y agua ha permitido extender este concepto a la determinación de compuestos anfífilicos utilizando mezclas de los dos disolventes. Por otro lado, el aspecto más novedoso de las investigaciones realizadas se recogen en el bloque II de esta Memoria, donde se describen disolventes constituidos por agregados inversos de alcoholes alifáticos, con composición y estructura programable de acuerdo al ambiente en el que se produce la autoasociación, y adsorbentes hemimicelares irreversibles magnéticos, con excelentes prestaciones para su uso en extracciones en fase sólida dispersivas. A continuación se resumen las principales conclusiones obtenidas.

### ***BLOQUE I: Métodos rápidos para el análisis de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales y alimentos***

Los métodos propuestos para el control de contaminantes en muestras líquidas, tanto ambientales como agroalimentarias, estuvieron basados en la microextracción de los contaminantes con disolventes supramoleculares (SUPRASs) constituidos por micelas inversas de ácido decanoico en mezclas de THF y agua y generados por un proceso de *self-assembly*. Estos SUPRASs proporcionan diferentes tipos de interacciones (principalmente de dispersión y formación de puentes de hidrógeno) para la extracción de compuestos orgánicos y poseen una elevada concentración de tensioactivo (0.25-0.75 mg/ $\mu$ L) y por lo tanto, un elevado número de centros de solubilización, lo cual posibilita llevar a cabo microextracciones líquido-líquido con volúmenes

de SUPRAS de 100-150  $\mu\text{L}$ . Se proponen métodos para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenoles y ocratoxina A cuyas principales ventajas son:

- a) Elevada eficacia de extracción. Las recuperaciones obtenidas son cuantitativas para todos analitos ( $>78\%$ ) e independientes de la composición de la matriz.
- b) Simplicidad. Las extracciones se llevan a cabo en una única etapa y no se requieren etapas de limpieza.
- c) Elevada frecuencia de muestreo. La extracción de los analitos se realiza en tiempos comprendidos entre 10 y 20 minutos y, dada la simplicidad del procedimiento analítico utilizado, es posible tratar varias muestras simultáneamente.
- d) Bajo volumen de disolvente orgánico empleado en la extracción (0.8-4 mL de THF por muestra) en comparación con metodologías basadas en disolventes convencionales.
- e) Bajo volumen de muestra (10.8-36 mL)
- f) Robustez. La eficiencia de extracción no es dependiente de variables tales como fuerza iónica, temperatura o componentes de la matriz.
- g) Factores de concentración suficientemente altos (65-288) para obtener la sensibilidad requerida para el cumplimiento de la legislación, sin necesidad de etapas de evaporación-concentración.

Dentro de las investigaciones incluidas en este bloque se propone también un método para la microextracción de un amplio grupo de compuestos perfluorados (PFCs) en alimentos basada en la formación de agregados inversos de los analitos en una mezcla de THF y agua. Las principales ventajas de esta metodología son:

- a) Elevada eficiencia de extracción para PFCs (>75% para ácidos y sulfonatos con longitudes de cadena de entre 4 y 14 átomos de carbono) en distintos tipos de alimentos (carne, pescado, queso, frutas y verduras).
- b) Simplificación de la etapa de limpieza de la muestra mediante el acoplamiento en línea de los adsorbentes utilizados (intercambiador aniónico débil-carbón activo). Esta etapa junto con el uso de una columna perfluorada, que proporciona mecanismos de retención selectivos, permitieron reducir la presencia de efecto matriz e interferencias en la variedad de alimentos ensayados, mejorando así la exactitud del método.
- c) Elevada sensibilidad (límites de detección entre 1 y 30 pg/g) para monitorizar estos compuestos emergentes a los bajos niveles esperados en alimentos, lo cual es una demanda urgente por parte de las autoridades Europeas para evaluar el riesgo para la salud por PFCs.

***BLOQUE II: Diseño, síntesis y estudio de nuevos disolventes y adsorbentes supramoleculares.***

Los disolventes supramoleculares descritos por vez primera en esta Memoria están constituidos por alcoholes alifáticos (7-14 átomos de carbono) en mezclas de THF:agua. Los resultados a destacar del estudio de este nuevo sistema extractante son los siguientes:

- a) Se han obtenido por vez primera disolventes con morfología hexagonal inversa en los que el tamaño de las gotas de coacervado, la microestructura interna y la composición puede programarse en función de la composición de la mezcla THF y agua en la que se lleva a cabo la autoasociación de las moléculas de los alcoholes alifáticos. La estructura y composición es

reversible, modificándose con las condiciones ambientales. Se trata por tanto de sistemas adaptativos.

- b) Los disolventes pueden utilizarse en todo el intervalo de pH, ya que la molécula para la formación de los agregados inversos debe estar protonada y el valor estimado de pKa para los alcoholes alifáticos es de 15.
- c) Las aplicaciones desarrolladas abren nuevas perspectivas en la extracción con disolventes, ya que dada la particular microestructura de los SUPRASs sintetizados se ha podido demostrar que pueden utilizarse como materiales de acceso restringido.
- d) El estudio de la distribución de los clorofenoles cancerígenos entre el disolvente supramolecular, que ofrece un mecanismo mixto para su solubilización, y la disolución de equilibrio, permite predecir, en base al parámetro de solubilidad de Hidelbrand y los componentes que lo integran, el comportamiento de los solutos en función de las variables experimentales, facilitando de esta forma el proceso de optimización.

Se propone también el uso de un nuevo adsorbente supramolecular de alquilcarboxilatos quimiadsorbidos sobre nanopartículas magnéticas y se optimiza para la extracción de PAHs cancerígenos en aguas a través de SPE dispersiva. La irreversibilidad de los agregados, gracias a la naturaleza del enlace covalente entre el carboxilato y los átomos de hierro de la magnetita, constituyen una ventaja fundamental de este sistema frente a los adsorbentes supramoleculares convencionales, formados por la fisisorción de tensioactivos con carga opuesta a la del óxido mineral. Las ventajas que se derivan de esta propiedad son las siguientes:

- a) Extractos libres de tensioactivo, lo cual facilita el posterior acoplamiento con técnicas de separación/detección.

- b) Intervalo de pH de trabajo amplio (limitado en el caso de los adsorbentes supramoleculares generados por procesos de fisioadsorción).
- c) Reusabilidad.

Por otro lado, las nanopartículas magnéticas permiten llevar a cabo extracción en fase sólida dispersa, retirando el adsorbente tras la extracción con la ayuda de un simple imán. La extracción en fase sólida dispersa es simple, permite mayores volúmenes de ruptura que la SPE convencional y evita obstrucciones en comparación con el formato tradicional en cartucho.



## CONCLUSIONS

Results presented in this Thesis have led to the elucidation of basic aspects about the formation, composition and structure of supramolecular solvents made up of inverse aggregates of carboxylic acids in THF:water mixtures, widening their applicability for contaminants and matrices not explored so far. On this basis, the mixture THF:water was used for the efficient extraction of other types of amphiphiles. The most innovative aspects of results presented in this Thesis are discussed in the second section, namely a new supramolecular solvent made up of inverse aggregates of aliphatic alcohols whose composition and aggregate size are programmable in function of the experimental conditions for the self-assembly synthesis, and a supramolecular adsorbent made up of irreversible hemimicellar aggregates and with magnetic properties, as a suitable tool for dispersive solid-phase extraction. Main conclusions are presented below.

### ***SECTION I: Rapid methods for the analysis of priority and emergent contaminants in environmental samples and foods***

Rapid methods developed for contamination control in liquid environmental and agri-food samples were based on supramolecular solvent extraction (SUPRASs) made up of reverse micelles of decanoic acid in mixtures of tetrahydrofuran (THF):water formed by a self-assembly procedure. These SUPRASs provide hydrophobic interactions and hydrogen bonds as driving forces for extraction of contaminants. They contain a high concentration of surfactant (0.25-0.75 mg/ $\mu$ L) and consequently a multiligand ability for extraction, thus allowing for the design of liquid-liquid microextractions with volumes of SUPRASs of about 100-150  $\mu$ L. Analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons,



bisphenol A, F and diglycidyl ethers and ochratoxin A are proposed, whose main advantages are:

- a) High extraction efficiency. Recoveries were always quantitative (>78%) and independent on the matrix composition.
- b) Simplicity. The extraction is carried out in a single step without the need of further clean-up.
- c) High sampling rate. The time required for extraction is 10-20 min per sample and due to the simplicity of the procedure several samples can be simultaneously treated.
- d) Low volume of organic solvent required for extraction in comparison with procedures involving conventional organic solvents (0.8-4 mL of THF per sample).
- e) Low sample volume (10.8-36 mL)
- f) High robustness. The extraction efficiency is not dependent on variables such as ionic strength, temperature or matrix components.
- g) Concentration factors high enough (65-288) without the need of evaporation steps to reach the required sensitivity for compliance of legislation.

On the other hand, a suitable method for the extraction of a wide polarity range of perfluorinated compounds (PFCs) in foods is proposed in this section, which is based on a mixture of THF:water as a suitable solvent for amphiphilic compounds by forming inverse aggregates. Main advantages of this method are:

- a) High extraction efficiency for a wide polarity range of PFCs (>75% for acids and sulfonates with a chain length of 4-14 carbon atoms) in different foods (meat, fish, cheese, vegetables and fruits).
- b) High selectivity due to the combination of an efficient clean-up based on two in-line SPE (weak anion exchanger and active carbon), the in-line coupling simplifying this step, and the use of a perfluorooctyl stationary column providing selective retention mechanisms in order to reduce matrix effects and mass interferences.
- c) High sensitivity (detection limits in the range 1-30 pg/g) to guarantee the monitorization of PFCs at the low levels expected in food, thus providing a useful tool for European Food Safety Authorities that claim the urgent need for PFCs risk assessment in food.

## ***SECTION II: Design, synthesis and study of new supramolecular solvents and adsorbents***

A new supramolecular solvent is described here for the first time made up of aggregates of long chain aliphatic alcohols (7-14 alkyl chain carbon atoms) dispersed in a THF:water mixture. The main outstanding results of the study of this extractant are the followings:

- a) An inverse hexagonal morphology has been observed for the first time in this type of solvents, being the coacervate droplet size and their internal microstructure and composition programmable in function of the THF:water ratio in the bulk solution in which self-assembly of aliphatic alcohols take place. The structure and composition are reversible by changing

environmental conditions and so, they behave as adaptative materials.

- b) A valuable asset of these solvents is their capacity to extract solutes in the entire pH range because n-alkanols do not dissociate in water ( $pK_a \sim 15$ ) and in this way their ordered inverse structure is kept
- c) The particular microstructure of the supramolecular solvents (SUPRASs) open up new research lines for the design of *Restricted Access Materials* (RAMs), thus providing SUPRASs with enhanced selectivity.
- d) The study of the distribution of carcinogenic chlorophenols between the SUPRASs and the equilibrium solution on the basis of the Hildebrand solubility parameter and composition, allows for prediction of the extraction efficiency for different contaminants in function of experimental variables, thus making easier method optimization.

On the other hand, a new adsorbent made up of hemimicelles of alkylcarboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles is designed. A method for the determination of carcinogenic PAHs in environmental waters is optimized by performing a dispersive SPE. Differently from conventional supramolecular adsorbents (made from ionic surfactant physisorbed on oppositely charged mineral oxides), the most important characteristic of this adsorbent is the irreversible nature of the aggregates due to the covalent bond between the carboxylate group of the surfactant and the iron atoms of magnetite. Main advantages that arise from this property are:

- a) Surfactant-free extracts, thus making the subsequent coupling with separation/detection techniques easier.

- b) Wider pH working range than conventional supramolecular adsorbent made by physisorption processes.
- c) Reusability to a certain extent.

Furthermore, a dispersive SPE is easily made by means of a magnet to isolate the adsorbent after extraction. The dispersive SPE format offers higher simplicity and breakthrough volumes in comparison with the conventional cartridges.



---

## APÉNDICE A. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

---

1. **Determination of bisphenols A y F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry**

Ana Ballesteros-Gómez, Francisco-Javier Ruiz, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

*Analytica Chimica Acta*, 603 (2007) 51-59

.....

Factor de Impacto (posición revista/nº total revistas); área Química Analítica, 2007 (JCR): 3.641 (5/70)

2. **Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

*Journal of Chromatography A*, 1203 (2008) 168-176

.....

Factor de Impacto (posición revista/nº total revistas); área Química Analítica, 2008 (JCR): 3.756 (6/70)

3. **Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 530-539

.....

Factor de Impacto (posición revista/nº total revistas); área Química Analítica, 2009 (JCR): 4.101 (4/70)

- 4. Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles: study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio

*Analytical Chemistry*, 81 (2009) 9012–9020

.....

Artículo premiado con un accésit en la convocatoria 2011 del premio *Marie Curie para jóvenes investigadores* otorgado por la Córdoba y el Instituto Andaluz de Química Fina y Nanoquímica (IAQFN)

Factor de Impacto (posición revista/nº total revistas); área Química Analítica, 2009 (JCR): 5.214 (3/70)

- 5. Tetrahydrofuran-water extraction, in-line clean-up and selective liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of perfluorinated compounds in food at the low pictogram per gram level**

Ana Ballesteros Gómez, Stefan van Leeuwen, Soledad Rubio

*Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5913-5921

.....

Factor de Impacto (posición revista/nº total revistas); área Química Analítica, 2010 (JCR): 4.194 (7/71)

- 6. Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio.

Enviado a *Analytical Chemistry* (Septiembre 2011)

---

## APÉNDICE B. ARTÍCULOS DE REVISIÓN Y CAPÍTULOS DE LIBRO

---

**1. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

*Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 449-469

.....

Mención de *Top cited reviews 2008-2009* de la revista *Journal of Chromatography A (Elsevier)*

**2. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review**

Ana Ballesteros Gómez, María Dolores Sicilia Criado, Soledad Rubio Bravo

*Analytica Chimica Acta*, 677 (2010) 108-130

**3. Recent Advanced in Environmental Analysis**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio.

*Analytical Chemistry*, 83 (2011) 4579-4613

.....

**Classified as Top 10 Most Read Articles for Q2 for Analytical Chemistry (access: September 2011, JCR)**

**4. Supramolecular Analytical Chemistry in Separation Techniques**

Ana Ballesteros Gómez, María Dolores Sicilia Criado, Soledad Rubio Bravo.

*Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.) págs. 595-615, 2010 Wiley, Indianapolis, USA

**5. Bisphenol A**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio Bravo

*Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*. L.M.L. Nollet (Ed.), págs. 349-365, 2011, Wiley-Blackwell, Iowa, USA.



## APÉNDICE C. COMUNICACIONES A CONGRESOS

---

### Comunicaciones orales

**1. Potential of coacervates for the extraction of contaminants from liquids foods**

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio Bravo, María Dolores Pérez-Bendito

*3rd International Symposium on recent advances in food analysis*, Praga, República Checa (2007)

**2. Hemimicelles of Alkyl Carboxylates Chemisorbed onto Magnetic Nanoparticles: Study and Application to the Extraction of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Samples**

Ana Ballesteros Gómez, Soledad Rubio Bravo

*Nanouco. II Encuentro sobre nanociencia y nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba*, Córdoba (2010)

**3. Environment responsive alkanol-based nanostructured solvents: phenomenon description and potential in analytical extractions (comunicación aceptada)**

Ana Ballesteros Gómez, Soledad Rubio Bravo

*13<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona (2011).

## Póster

1. **Use of alkyl carboxylic acid reversed micelles-based coacervation for the extraction of bisphenols from wastewater samples**

Ana Ballesteros-Gómez, Francisco Javier Ruiz Moreno, Soledad Rubio Bravo, María Dolores Pérez-Bendito

*19th Conference of the European Colloid and Interface Society*, Geilo, Noruega (2005)

2. ***Use of decanoic acid reversed micelles-based coacervation for the extraction of PAHs from surface water and wastewater samples***

Ana María Ballesteros Gómez, Soledad Rubio Bravo, María Dolores Pérez Bendito

*34th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry*, Hamburgo, Alemania (2006)

3. **Quantitation of perfluorinated compounds in food at the low pg/g level: development of a tetrahydrofuran–water extraction system with in-line clean-up**

Ana Ballesteros Gómez, Stefan van Leeuwen, Soledad Rubio Bravo

*30<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs)*, San Antonio, Texas (2010)

4. ***Determinación de clorofenoles cancerígenos en aguas superficiales y marinas mediante extracción con disolventes supramoleculares de micelas inversas y detección con CL-UV***

Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio Bravo

*GRASEQA 2010 XII Reunión del grupo regional andaluz de la sociedad española de química analítica*, Córdoba, España (2010)









