



**Programa de Doctorado
en Química**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  Facultat de Química

CARACTERIZACIÓN y SEGUIMIENTO DE CONTAMINANTES EMERGENTES

TESIS DOCTORAL

RODRIGO ALEJANDRO GONZÁLEZ

MARZO 2016

Directores de Tesis:

Pilar Campins Falcó

Jorge Verdú Andrés

Carmen Molins Legua

Dedicado a mi tío Alejandro cuya inesperada
partida nos dejó un gran vacío. Su recuerdo
intacto, motivo de inspiración y fuerza, nos
acompañará hasta el ocaso de nuestras vidas.

“Two roads diverged in a Wood and I – I took
the one less traveled by, and that has made all
the difference.” (Robert Frost)

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis directores de Tesis (Pilar, Jorge y Carmen) por todo el apoyo y la ayuda brindados a lo largo de estos años de doctorado que comenzó con el máster por el año 2011. De entre ellos, doy las gracias a Pilar por haber tenido la paciencia necesaria para conmigo ya que mi expediente, bastante particular, ha requerido un gran número de trámites y procedimientos relacionados. También, agradezco a las profesoras de mi grupo de investigación (Yolanda y Rosa), que aunque no sean rigurosamente directoras de este trabajo, me han ayudado de la misma forma.

En el mismo marco, doy las gracias a mis compañeros de doctorado (Anabel, Javier, Maria, Neus y Pascual) por todo el apoyo entregado y con los cuales, he compartido muchos momentos importantes de mi vida. Sin ellos y sin mis profesores de grupo mencionados anteriormente, realizar este trabajo no hubiese sido posible.

Fuera de la universidad, pero también muy importantes y que aunque se encuentren al otro lado del mundo (en mi querida Viña del Mar) no pasa un día en que no piense en ellos, agradezco a mis padres (Sergio y Mónica) y mis hermanos (Camila y Felipe). Son mi mayor motor en la vida y sin ustedes no hubiese llegado al punto en que me encuentro hoy. No me olvido tampoco del resto de mis familiares (todos ellos en Chile), quienes me han otorgado fuerza en numerosas ocasiones.

Han sido bastantes años y de la experiencia de realizar el doctorado en una ciudad como Valencia, he podido entablar muchas amistades, las cuales han aportado en este proceso. De todas ellas, destaco a mi amigo Josh Renner, cuya ayuda con el inglés científico fue clave en la etapa final de la presente Tesis.

Por último doy las gracias a la Universidad de Valencia, por el contrato “Atracció de Talent” concedido, imprescindible para desarrollar y finalizar esta Tesis. Por otra parte, agradezco a la Universidad de Estrasburgo (en particular, al grupo de investigación del profesor Maurice Millet) por haberme acogido de la mejor forma durante los meses de mi estancia en el extranjero.

Abstract

Protecting the environment is an essential task in human societies. The main problem is that the pollution in the different environmental matrices has been increasing for centuries due to the anthropogenic activity of the different sectors (e.g. industry, agriculture, construction, among others). In this scenario and as a result of the advances in scientific fields such as analytical chemistry, “new” contaminants have been found in the environment. However, in some cases this contamination is not recent: modern methods now allow one to detect these substances. Therefore it is not a matter of prevention, but rather adopting the proper strategies, to diminish pollution.

These “new pollutants” are called emerging contaminants, a concept that involves many substances: new toxic compounds, the ones recently found in a given matrix or others whose toxic effects have been recently discovered despite their widespread use. On the other hand, known contaminants can have related by-products or derivatives, which can be considered as emerging pollutants. Thus, the problem becomes even more complex as time goes by.

Developing methods for characterizing or monitoring this kind of pollutants (i.e. methodologies that allow them to be detected or quantified in a specific environmental compartment) can be seen as the main topic of this Thesis. These methods are highly required and, alongside toxicological and occurrence studies, improve the quality and quantity of the information about emerging contaminants enabling the adoption of appropriate regulatory measures.

Different families of emerging contaminants as well as priority pollutants have been studied in this Thesis: pharmaceutical products, pesticides, nanomaterials, surfactants and derivatives of priority contaminants (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons). The analyses have been done in water, soils, sediments and air.

To accomplish this, most of the methodologies involve an interesting on-line extraction technique: in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (i.e. conventional, capillary or nanochromatography). This simple technique, which can be improved by using nanomaterials as adsorbents, enables sample extraction, preconcentration and clean-up processes in a unique system (coupled to separation and detection). Therefore, the main characteristics of the resulting procedures are simplicity, sensitivity and minimum sample handling.

New system configurations, methods and materials, as well as improving reported methodologies or applying them for the first time in the analysis of a particular compound are the strategies proposed in this Thesis. All of them are a step forward in the study of

emerging contaminants. These substances are far from being eradicated, but they can be better controlled in the environment with strategies such as those mentioned above.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Contaminantes Emergentes	3
1.2 Marco legislativo	8
1.2.1 Nivel europeo	8
1.2.2 Nivel estatal	11
1.2.3 Nivel autonómico	13
1.3 Matrices ambientales	14
1.4 Microextracción en fase sólida en tubo acoplada a técnicas cromatográficas	21
1.4.1 Acoplamiento a LC	22
1.4.2 Acoplamiento a sistemas miniaturizados	24
1.4.3 Materiales adsorbentes	24
1.5 Sustancias analizadas	29
1.5.1 Fármacos	29
1.5.1.1 Diclofenaco	31
1.5.2 Pesticidas	35
1.5.2.1 OPs	37
1.5.2.2 Triazinas	38
1.5.2.3 Métodos analíticos para determinar OPs y triazinas	40
1.5.3 Nanomateriales	44
1.5.3.1 AgNPs	46
1.5.3.2 AuNPs	49
1.5.3.3 Métodos analíticos para estudiar NPs	50
1.5.4 Surfactantes	55

1.5.5 PAHs y derivados	58
1.5.5.1 Métodos de extracción y de determinación de PAHs y derivados	64
2. Objetivos	69
3. Metodología Experimental	77
3.1 Reactivos	79
3.2 Instrumentación	81
3.2.1 Técnicas espectroscópicas	82
3.2.1.1 Espectrofotometría UV-Vis	82
3.2.1.2 Espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito	82
3.2.1.3 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	83
3.2.1.4 Espectroscopía infrarroja (IR)	83
3.2.2 Técnicas microscópicas	84
3.2.2.1 Microscopía óptica	84
3.2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	84
3.2.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	85
3.2.3 Técnicas cromatográficas	86
3.2.3.1 HPLC-FLD	86
3.2.3.2 Cap-LC-DAD	87
3.2.3.3 Nano-LC-DAD	88
3.2.3.4 GC acoplada a MS	88
3.3 Técnicas de extracción	90
3.3.1 Procedimientos de extracción fuera de línea	90
3.3.1.1 MSPE	90
3.3.1.2 MSPD	91

3.3.1.3 UAE	92
3.3.1.4 PLE (ASE)	92
3.3.2 Procedimientos de extracción en línea	92
3.3.2.1 IT-SPME en válvula (acoplado a HPLC o Cap-LC)	93
3.3.2.2 IT-SPME magnética en válvula (acoplado a Cap-LC)	95
3.3.2.3 IT-SPME en válvula (acoplado a nano-LC)	96
3.4 Síntesis de nanomateriales adsorbentes, capilares y AgNPs	98
3.4.1 Síntesis de las NPs de Fe ₃ O ₄ , del nanomaterial de Fe ₃ O ₄ y del capilar magnético	98
3.4.2 Síntesis de otras columnas capilares para IT-SPME	101
3.4.3 Síntesis de AgNPs	103
3.5 Condiciones experimentales	105
3.6 Muestras	108
4. Diclofenaco en aguas	111
4.1 Columnas capilares empleadas para la determinación de diclofenaco en aguas	113
4.2 Caracterización por SEM de las columnas capilares	114
4.3 Optimización de las condiciones nanocromatográficas	115
4.4 Tiempo de transferencia	116
4.5 Efectos en el sistema de las dimensiones de las columnas capilares: longitud e i.d.	117
4.6 Calibración de la IT-SPME-nano-LC	119
4.7 Eficiencia de extracción	122
4.8 Selección de la columna capilar para el método desarrollado	123
4.9 Análisis de muestras de agua y Voltarén	124
4.10 IT-SPME-nano-LC vs IT-SPME-Cap-LC	125
4.11 Preconcentración en IT-SPME-nano-LC	126

4.12 Conclusiones	128
5. OPs y triazinas en aguas	131
5.1 Adsorbentes magnéticos en técnicas analíticas (antecedentes)	133
5.2 Superparamagnetismo	134
5.3 Caracterización del nanomaterial magnético y de los analitos	135
5.4 MSPE. Capacidad adsorbente del nanomaterial.	137
5.5 Magnetic-IT-SPME	140
5.5.1 Inyección en el sistema	140
5.5.2 Optimización de B	141
5.5.3 Comparativa de eficiencias de extracción	142
5.5.4 Explicación del efecto de B sobre la eficiencia de extracción de los analitos	144
5.6 Calibración del método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD. Parámetros analíticos.	146
5.6.1 OPs	146
5.6.2 Triazinas	147
5.7 Aplicabilidad del método	148
5.8 Conclusiones	148
6. AgNPs en matrices acuosas (Parte 1)	151
6.1 Principio del método UV-Vis propuesto	153
6.2 Procedimiento de derivatización y medida espectrofotométrica	154
6.3 Síntesis de AgNPs analizadas, SPRB y caracterización por TEM	154
6.4 Optimización y calibración del método desarrollado	157
6.5 Estudios preliminares en el análisis de AgNPs por el método propuesto	158
6.6 Calibración por el método de adición estándar	160
6.7 Análisis de síntesis fotoquímicas	160

6.8 Estudios sobre la naturaleza de la Ag ⁺ residual determinada	161
6.9 Extensión del método: análisis de síntesis térmicas	162
6.10 Conclusiones	163
7. AgNPs en matrices acuosas (Parte 2). Otros ECs.	165
7.1 Análisis de AgNPs (antecedentes)	167
7.2 Señal en UV-Vis. Relación con el tamaño de las NPs.	168
7.3 Optimización de las condiciones cromatográficas en el sistema Cap-LC	169
7.4 Relación entre la señal analítica en Cap-LC y el tamaño de las NPs	171
7.5 Método Cap-LC-DAD	172
7.5.1 Calibración del método Cap-LC-DAD	172
7.5.2 Caracterización de muestras de diferente tamaño y validación del método propuesto	174
7.5.3 Dependencia de la señal en Cap-LC con la concentración de AgNPs. Otros estudios.	179
7.5.4 Otras aplicaciones y usos potenciales del método propuesto	180
7.6 IT-SPME: estudios preliminares y optimización	183
7.6.1 Interacción entre AgNPs y capilares. Dependencia entre la señal obtenida y [AgNPs].	183
7.6.2 Efecto del agua y mecanismo de separación en IT-SPME-Cap-LC	186
7.6.3 Optimización de la columna capilar en el estudio de dispersiones acuosas de AgNPs	186
7.6.4 Separación por tamaños y distribución de las señales	187
7.7 Método IT-SPME-Cap-LC-DAD. Estudios de otros ECs.	189
7.7.1 Calibración del método propuesto	189
7.7.2 Extensión del método a otras NPs esféricas: las AuNPs	191
7.7.3 Comparación con otras técnicas	193
7.7.4 Dependencia de la señal con el diámetro hidrodinámico. Estudio de surfactantes.	197
7.8 Conclusiones	198

8. AgNPs en suelos	199
8.1 Análisis de AgNPs en suelos, una matriz compleja	201
8.2 Muestras de suelos y procedimientos de contaminación	202
8.3 Caracterización de las sustancias	203
8.3.1 Patrón de AgNPs	203
8.3.2 Muestras de suelos	204
8.3.3 Caracterización de PSD de suelos por microscopía óptica	207
8.4 Estudios preliminares	208
8.5 Estudios por Cap-LC-DAD: series temporales A, SB y W	210
8.6 IT-SPME-Cap-LC-DAD	212
8.6.1 Calibración	212
8.6.2 Estudios de suelos	213
8.7 Porcentaje de retención de la AgNPs	217
8.7.1 En suelos diferentes	217
8.7.2 En fracciones de tamaño diferente para un determinado suelo	218
8.8 Microanálisis de SEM	220
8.9 Conclusiones	221
9. PAHs en sedimentos (Parte 1)	223
9.1 MSPD como técnica de extracción innovadora. Interés de su optimización.	225
9.2 MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD	226
9.3 Tratamiento de la fase adsorbente	228
9.4 MSPD con adsorbente sin tratar	228
9.5 Lavado previo del adsorbente	230
9.6 Lavado con ultrasonidos (UAE)	231

9.7 Utilidad del procedimiento propuesto	235
9.7.1 Aplicación a otras fases adsorbentes	235
9.7.2 Aplicación a muestras reales	236
9.8 Conclusiones	240
10. PAHs en sedimentos (Parte 2)	241
10.1 UAE como técnica de extracción innovadora. Acoplamiento a IT-SPME.	243
10.2 UAE-IT-SPME-HPLC-FLD. Condiciones específicas de determinación.	244
10.3 Compatibilidad de los disolventes utilizados en la UAE con la IT-SPME	245
10.4 Optimización de las condiciones de la UAE	248
10.5 Validación del método propuesto	252
10.6 Utilidad del método desarrollado	258
10.7 Conclusiones	258
11. PAHs and their derivatives in air samples	261
11.1 Background information. Different MS modes.	263
11.2 GC-MS for the determination of PAHs	265
11.2.1 System optimization	265
11.2.2 Method calibration	267
11.2.3 Air samples. Validation of the method.	268
11.3 Methods for estimating PAH derivatives	269
11.3.1 GC-MS/MS preliminary studies	269
11.3.2 GC-MS (EI and CI) preliminary studies	272
11.4 Comparison of the 3 developed methodologies	276
11.5 Conclusions	277
12. Conclusions	281

Bibliografía	285
Abreviaturas	319
Listado de Figuras	327
Listado de Tablas	341
Anexos	347

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes Emergentes

Hasta hace no mucho tiempo atrás, el interés y preocupación en materia de contaminación se centraban en aquellos compuestos de conocida toxicidad que se encuentran en gran cantidad en el medio ambiente. Estos compuestos de naturaleza química diversa (orgánica, metálica u organometálica), peligrosos para el ser humano y/o el medio ambiente, han sido estudiados durante décadas por la comunidad científica. No obstante, en la actualidad el desarrollo de nuevos métodos de análisis y los avances en el campo de la toxicología han puesto en evidencia otros contaminantes que, sin representar una amenaza en principio, precisan ser estudiados con la misma intensidad. Dichas sustancias han sido denominadas como contaminantes emergentes (ECs). Ya sea por escasez de técnicas lo suficientemente sensibles como para detectarlos o bien por uso no regulado a causa de la falta de información sobre los riesgos potenciales para la vida, los ECs se encuentran de manera extendida en los diferentes compartimentos del medio ambiente. Por lo tanto, la presencia de los ECs no es nueva, no así la preocupación que ellos despiertan.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha definido a los ECs como: “químico o material que se presenta como un amenaza potencial o real para la salud humana y/o medioambiental o para los que existe una falta de normas vigentes de salud” [1]. Se trata en muchos casos de sustancias de uso cotidiano (Ver **Tabla 1**): productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), plastificantes, pesticidas, retardantes de llama, drogas de abuso, surfactantes, nanomateriales, entre otros (incluyendo posibles derivados, metabolitos o productos de transformación). Son contaminantes orgánicos (OCs), inorgánicos y organometálicos que, al ser producidos a escala industrial de manera indiscriminada, están presentes en las diferentes matrices del medio ambiente. Algunos de ellos son persistentes (pudiendo ser clasificados como contaminantes orgánicos persistentes, POPs) permaneciendo inalterados por un largo tiempo. Dependiendo de la matriz, un contaminante se considera persistente si su vida media es superior a 2 meses (para aguas) o 6 meses (suelos y sedimentos) [2]. Sin embargo, no es una característica necesaria: los ECs, que son susceptibles a biodegradación, son introducidos constantemente al medio ambiente debido a una producción masiva y un consumo elevado [3]. Es más, en algunos casos, los ECs pueden biodegradarse en intermedios que pueden ser más tóxicos para el medio ambiente que sus precursores [4]. Por consiguiente, el problema de los ECs se agudiza aún más.

Existen características comunes en cuanto a riesgos que pueden ocasionar los ECs. Además de poder ser tóxicos para la salud por exposición directa, estos contaminantes pueden provocar en animales y humanos por reactividad bioquímica efectos tales como: inmunotoxicidad, neurotoxicidad, carcinogenicidad y disrupción endocrina [5]. Las sustancias que pueden ocasionar este último efecto negativo han sido objeto de intensa

investigación científica en el presente, promoviendo significativamente el interés por estudiar los ECs [6]. Algunos de ellos son disruptores endocrinos (EDCs) y han sido definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como: “sustancias exógenas que alteran las funciones del sistema endocrino y por tanto causan efectos adversos para la salud de los organismos sanos, a su descendencia y a las poblaciones en general” [7]. Entre los EDCs se encuentran algunos pesticidas, plastificantes, retardantes de llama, entre otros compuestos, existiendo una similitud estructural entre ellos y las hormonas endógenas humanas. Por ejemplo, un retardante de llama de la familia de los éteres de difenilo polibromados, específicamente, el PBDE-100, se asemeja a la hormona triyodotironina (T3) y por lo tanto, el PBDE-100 competiría por los sitios de unión en los receptores de esta hormona [8]. Sin embargo, el parecido estructural no es requisito excluyente para que se produzca la disrupción endocrina [6].

Tabla 1. Grupos y ejemplos representativos de ECs. Los asteriscos indican los compuestos que han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Unión Europea.

Grupos	Ejemplos
PPCPs	
Analgésico/Antiinflamatorio	Diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno
Antibióticos	Amoxicilina, sulfametoxazol, eritromicina
Antiepilépticos	Carbamazepina, primidona
B-bloqueantes	Atenolol, metoprolol
Hormonas	17 β -estradiol
Estimulantes	Cafeína, nicotina
Almizcles	Galaxolide (HHCB), cetona de almizcle
Filtros ultravioleta (UV)	Octocrileno (OC)
Agentes antisépticos	Triclosán, triclocarbán
Repelente de insectos	N,N-dietil-meta-toluamida (DEET)
Pesticidas	Atrazina*, simazina*, terbutilazina (TBA), clorfenvinfos*, clorpirifos*, malatión
Drogas de abuso	Cocaína, Anfetamina, Morfina
Plastificantes	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)*, Bisfenol A (BPA)
Retardantes de llama	Éteres de difenilo polibromados (PBDEs)*, hexabromociclodecanos (HBCDs)
Surfactantes	Nonilfenol* ¹ , compuestos amonio cuaternario
Nanomateriales	Nanopartículas (NPs), nanotubos de carbono (CNTs)

¹derivados

Por otra parte, la mayoría de los ECs poseen elevada afinidad por los tejidos grasos. Teniendo en cuenta la persistencia de los ECs, se pueden producir procesos como bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación de éstos en los diferentes organismos.

El término bioacumulación hace referencia al consumo, almacenamiento y acumulación de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos del medio ambiente por parte de los organismos. La bioconcentración y la biomagnificación pueden ser entendidas como casos específicos de bioacumulación. Ejemplificando, los peces pueden bioacumular contaminantes de dos formas: incorporando sustancias presentes en el agua a través de las branquias luego de exposición directa (bioconcentración) o por ingesta de alimentos contaminados que luego se absorben a través de las mucosas intestinales (biomagnificación) [9]. Por consiguiente, los ECs pueden potencialmente tener un impacto en los distintos eslabones de la cadena alimenticia [10].

Considerando su omnipresencia, persistencia, los riesgos por exposición y/o bioacumulación que pueden ocasionar en organismos, el interés por estudiar los ECs no ha hecho más que aumentar en los últimos años. Este hecho se ve respaldado por el incremento sostenido en el número de citaciones sobre los ECs en los últimos diez años (Ver **Figura 1**). Además, hay que tener en cuenta que los ECs representan un grupo en constante crecimiento: aparecen nuevas sustancias u otras que, ya siendo conocidas, suponen un riesgo reciente o que sólo han podido ser detectadas con métodos recientes. No es un término restrictivo: cualquier contaminante podría ser considerado como emergente dependiendo de las circunstancias. Como se ha discutido, un contaminante reconocido puede transformarse en derivados o intermedios de los cuales poco se conoce (pudiendo estos ser clasificados como ECs) [11]. Por otro lado, puede existir regulación (normas de calidad ambiental, NCA) acerca de un contaminante en una determinada matriz medioambiental y no en otra (por ejemplo, ciertos OCs regulados en aguas y no en biota [12]). Por último, el hallazgo de sustancias reguladas en nuevos entornos: por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), algunos de ellos contaminantes prioritarios en la Comunidad Europea [13] y en Estados Unidos [14], son considerados como ECs en ecosistemas árticos, en donde no habían sido detectados previamente [15].

En lo que respecta a ECs, un aspecto fundamental a considerar es la denominada “ocurrencia medioambiental” de éstos en el entorno. Este término implica diversas problemáticas: qué compuestos entran en el medio ambiente, con qué frecuencia, en qué niveles de concentración, en qué compartimentos se acumulan y cuál es su destino. Cómo se distribuye espacio-temporalmente determinado contaminante en las distintas matrices medioambientales depende tanto de su tasa de producción como de sus propiedades físico-químicas (volatilidad, solubilidad, polaridad, biodegradación, propiedades de adsorción, entre otras). Además, se debe considerar la naturaleza de la matriz medioambiental (aguas, aire, suelos, sedimentos y biota) con la que estos compuestos interaccionan [16].

Los ECs llegan al entorno acuático principalmente en los efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), a través de una eliminación incompleta de los

mismos en dichas instalaciones [17,18]. El proceso de eliminación de contaminantes recibe el nombre de remediación, en este caso, de aguas y constituye un tópico importante en la actualidad. La mayoría de los contaminantes son eliminados en los métodos tradicionales de tratamiento de aguas: por un lado, tratamiento primario (o físico-químico) para eliminar sólidos o partículas coloidales en suspensión; por otro, tratamiento secundario (o biológico) que utiliza bacterias para convertir la materia orgánica en sus componentes minerales. Para asegurar una eliminación de los ECs más efectiva, se pueden emplear otros métodos (reacciones fotocatalíticas [19,20] filtración en carbono activo granular (GAC) [21], ozonización [21,22] y tecnología de membranas [23]), los cuales se han implementado exitosamente a menor escala, pero siguen siendo económicamente inviables [18]. No obstante, estudios recientes han demostrado que no sólo los efluentes de las EDARs son las fuentes más importantes de ECs, sino también sistemas sépticos, infraestructura sujeta a filtraciones y vertederos [24]. Es más, en África, se ha encontrado de manera ubicua el repelente de insectos DEET en las aguas subterráneas analizadas [25]. En la misma línea de lo anteriormente expuesto, los ECs representan un problema de alta complejidad y que alcanza una dimensión global en el presente.

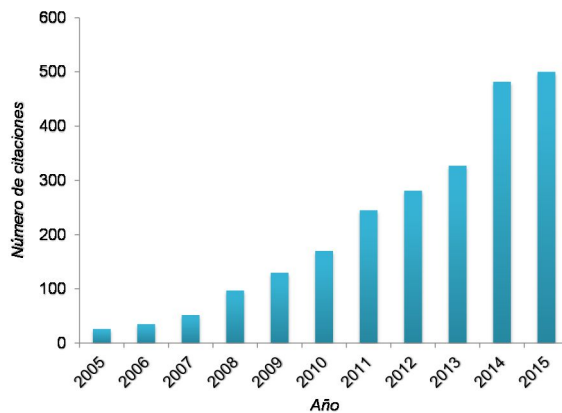


Figura 1. Evolución en el número de citas sobre ECs desde el año 2005. Fuente Web of Science (Noviembre 2015).

Como puede ser constatado, los ECs son un problema del que se ha tomado conciencia de forma tardía. El desarrollo científico avanza en la dirección de mejorar los métodos analíticos existentes y crear nuevos que permitan la identificación, la cuantificación y caracterización de los ECs en los distintos compartimentos medioambientales, además de

recabar más información sobre estos contaminantes a través de estudios de seguimiento, ocurrencia, toxicología y evaluación de riesgos. Posteriormente, habiendo identificado las áreas y los contaminantes involucrados, se establecen las normas pertinentes que permitan velar por la integridad de los seres vivos, así como de la calidad del medio ambiente que los rodea. Con esto, un determinado EC podrá ser considerado como contaminante prioritario. En la **Figura 2** se representa esquemáticamente el curso a seguir sobre la problemática actual de los ECs.

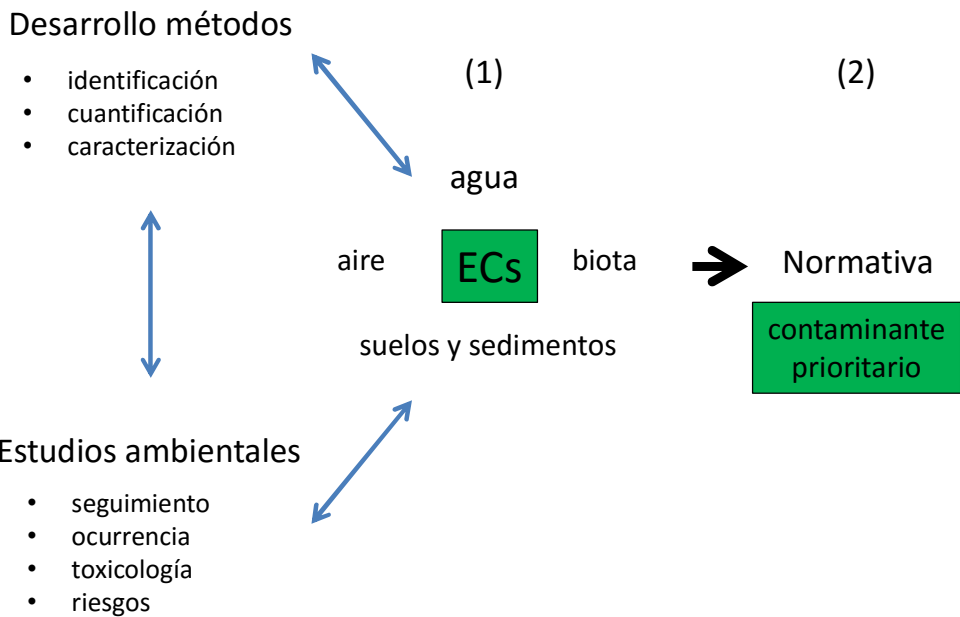


Figura 2. Esquema que muestra las etapas del trabajo científico sobre los ECs en su camino a ser considerados como contaminantes prioritarios. Etapas: (1) desarrollo de métodos y estudios ambientales de los ECs en las distintas matrices ambientales. (2) Normativa necesaria para que determinado EC pase a ser contaminante prioritario.

1.2 Marco legislativo

Como se ha establecido anteriormente, la gran mayoría de ECs no se encuentra regulada a nivel europeo ni español y sólo algunos de ellos se han incluido en la lista de contaminantes prioritarios. Sin embargo, es pertinente discutir la legislación vigente en torno a contaminantes en el sentido amplio. Las diferentes normativas, dependiendo del nivel de competencia, reciben una denominación particular: directivas y reglamentos (europeo), reales decretos y órdenes (estatal), decretos legislativos y leyes (autonómico). Cabe señalar que se ha regulado en materia de aguas y partir de ésta, se ha hecho extensivo al resto de matrices medioambientales.

1.2.1 Nivel europeo

Como antecedente, la política europea en materia medioambiental data del año 1972, fecha en la que tuvo lugar el Consejo Europeo en París. En él, los Jefes de Estado y Gobierno reconocieron la necesidad de establecer una política comunitaria sobre el medio ambiente que fuera de la mano con la expansión económica. Desde este hito y acotando el tema a contaminación de aguas, la cronología de directivas comienza el año 1975 destacando:

1975. Se estableció la Directiva del Consejo 75/440/CEE, de 16 de junio de 1975, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros.

1976. Se aprobaron 2 directivas: por una parte, la Directiva del Consejo 76/160/CEE, de 8 de diciembre de 1975, relativa a la calidad de las aguas de baño (modificada en 1991 y finalmente derogada en el año 2006); por otra parte, la Directiva del Consejo 76/464/CEE, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la comunidad.

1979. Se estableció la Directiva del Consejo 79/869/CEE, de 9 de octubre, relativa a los métodos de medición y a la frecuencia de los muestreos y del análisis de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros.

1980. Se aprobaron 2 directivas: en primer lugar, la Directiva del Consejo 80/68/CEE, de 17 de Diciembre de 1979, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas; en segundo lugar, la Directiva del Consejo 80/778/CEE, de 15 de Julio de 1980, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (modificada en 1998 en la Directiva 98/83/CE).

1991. Tras una década de directivas de carácter más específico, se aprobó la Directiva del Consejo 91/271/CEE, de 21 de Mayo de 1991 [26], sobre el tratamiento de las aguas

residuales (modificada en 1998 y remplazada finalmente por el Reglamento 1137/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de octubre de 2008). Con el objetivo de proteger al medio ambiente contra la contaminación de las aguas residuales, se diferenciaron las aguas residuales de acuerdo a su origen:

- Aguas residuales domésticas, provenientes de zonas residenciales y de servicios, siendo generadas fundamentalmente por las actividades domésticas y el metabolismo humano.
- Aguas residuales industriales, procedentes de los recintos utilizados para realizar cualquier actividad industrial o comercial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.
- Aguas residuales urbanas, definidas como aguas residuales domésticas o la mezcla de las mismas con aguas residuales industriales y/o aguas de escorrentía pluvial.

Además, se definieron los tratamientos primario (físico-químico) y secundario (biológico) en aguas residuales urbanas, comentados con anterioridad.

2000. Este año marca un hito importante en cuanto a legislación sobre aguas se refiere con la aprobación de la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000 [27] por la que se estableció un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas para que la lucha contra la contaminación fuese más efectiva. Por ello, se le denominó Directiva Marco del Agua (DMA) y entró en vigor el 22 de diciembre del 2000 reemplazando algunas de las directivas, transcurridos siete (Directivas 75/440/CEE, 79/869/CEE) y trece años (76/464/CEE, 80/68/CEE).

En la DMA, se detallan las medidas a tomar para proteger integradamente el agua, considerado como patrimonio y no como bien comercial, así como garantizar su calidad química y ecológica. Para conseguir esto, se estipuló reducir progresivamente la contaminación existente generada por los vertidos de sustancias tóxicas en el agua. En consecuencia, se clasificaron los contaminantes de acuerdo a su peligrosidad según:

- Sustancias contaminantes: “elementos que pueden causar disfunciones y por tanto deterioro del estado ecológico y/o químico” (Anexo VIII).
- Sustancias prioritarias: “elementos incluidos en el Anexo VIII que por su elevada toxicidad, relevancia o cantidad pueden proporcionar un riesgo significativo para la vida del medio acuático” (Anexo X).
- Sustancias prioritarias peligrosas: “elementos que son tóxicos, persistentes y bioacumulables”.

En la decisión 2455/2001/CE, se estableció una lista dinámica (revisada cada cuatro años) de 33 sustancias prioritarias, dentro de las cuales 14 se clasificaron como sustancias prioritarias peligrosas. En la DMA se estipuló que las emisiones y vertidos de sustancias tanto contaminantes como prioritarias deberían ser limitadas en lo progresivo, mientras que para las sustancias prioritarias peligrosas se fijó un plazo máximo de 20 años para su completa supresión.

2006. Como complemento a la DMA se adoptó la Directiva 2006/118/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de diciembre de 2006 [12], relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro. En ella, se consideró a las aguas subterráneas como el recurso hídrico natural más sensible e importante de la Unión Europea.

2008. Se aprobó la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 [13], relativa a las normas de calidad ambiental (NCA) en el ámbito de la política de aguas.

En dicha directiva, se definió la NCA como: “la concentración de un determinado contaminante o grupo de contaminantes en agua, sedimentos o biota, que no debe superarse en aras de la protección de la salud humana y el medio ambiente”. Este límite puede ser expresado como Media Anual (NCA-MA) o Concentración Máxima Admisible (NCA-CMA) y se estableció para sustancias prioritarias y otros contaminantes (8 adicionales) en aguas (y en biota en algunos casos). Se propuso estudiar dichas sustancias en otras matrices medioambientales (incluyendo sedimentos) dada su tendencia para bioacumularse como medida de seguimiento.

2009. Se estableció la Directiva 2009/90/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de julio de 2009 [28], en la cual aparecieron detalladas las especificaciones técnicas de análisis químico y de seguimiento del estado de las aguas. Se definieron criterios de funcionamiento mínimos para los métodos de análisis en el marco de los Estados miembros, así como normas para la determinación de las figuras de mérito. De no haber un método que se ajuste a dichos criterios, se permite el uso de la mejor técnica disponible.

2013. Se aprobó la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013 [29], por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. En ella, la lista de sustancias prioritarias aumentó hasta 45 (Anexo I). Además, se estipuló que en materia de planificación en el futuro (periodo 2015-2021), la NCA para las sustancias prioritarias existentes debe ser considerada.

1.2.2 Nivel estatal

Existen antecedentes de legislación en materia de aguas que datan de 1879, fecha en la que se promulgó la primera “Ley de Aguas”. Dicha ley establecía que: “el agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y para el ejercicio de la inmensa mayoría de las actividades económicas; es irremplazable, no ampliable por la mera voluntad del hombre, irregular en su forma de presentarse en el tiempo y en el espacio, fácilmente vulnerable y susceptible de usos sucesivos”. En este documento, se dio énfasis a aspectos relacionados con la cantidad y el consumo de este preciado recurso. Por otra parte y también en el siglo XIX, se comienza a discutir la actuación del poder político para encontrar soluciones futuras en lo relativo a la escasez y calidad hídrica. Con ello, surge la denominada planificación hidrológica.

Pasaron más de cien años, para que la Ley de Aguas quedara derogada por la entrada en vigor de la Ley 25/1985, 2 de agosto de 1985, que supuso un nuevo régimen jurídico del dominio público del agua en el marco de la Constitución y se distribuyeron competencias entre el Estado y las autonomías.

El 1 de enero de 1986 se hizo efectiva la entrada de España a la Comunidad Europea. Para lograr compatibilizar la legislación europea con la estatal, se han aprobado diversos reales decretos en los que se transponen las medidas de las directivas al marco español. Entre los hitos importantes de este proceso se encuentran:

2001. Se aprobó el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, quedando derogada la Ley 25/1985 en donde se incorporó al derecho español la DMA, i.e. se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. La transposición se completó con la Ley 62/2003, de 30 de diciembre de 2003, donde se tratan principalmente cuestiones relativas a planificación hidrológica.

2003. Como medida complementaria a la transposición de la DMA, se adoptó el Real Decreto Legislativo 140/2003, de 7 de febrero, incorporando al derecho español la Directiva 98/83/CE, modificativa de la Directiva 80/778/CEE relativa a los criterios sanitarios de la calidad de agua de consumo humano.

2007. Dos actos normativos fueron adoptados por el estado español en cumplimiento con la DMA: los Reales Decretos Legislativos 125/2007 (2 de febrero) y 907/2007 (6 de julio) en los que se fijan las demarcaciones hidrográficas y se aprueba el reglamento de planificación hidrológica respectivamente.

2015. Se aprobó el Real Decreto Legislativo 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales

y las normas de calidad ambiental (NCA). Este Real Decreto derogó al establecido el año 2011 (Real Decreto Legislativo 60/2011, de 21 de enero) y transpone la Directiva 2013/39/UE en vigor, a su vez modificativa de las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE. Con esto, se da un paso importante para armonizar reglamentación estatal y europea.

En otra línea temática, se promulgó en el año 1989 el Real Decreto Legislativo 258/1989, de 10 de marzo, por el que se establecía la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar. En cuanto a protección de aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro, se aprobó el Real Decreto Legislativo 1514/2009, de 2 de octubre de 2009. Actualmente, se encuentra vigente el Real Decreto Legislativo 815/2013, de 18 de octubre de 2013, en donde se aprobó el reglamento de emisiones industriales establecido en la Ley 16/2002, de 1 de julio de 2002, relativo a la prevención y control integrados de la contaminación, cuya normativa regula el vertido de aguas residuales en las cuencas hidrográficas intercomunitarias.

La **Figura 3** muestra las transposiciones de directivas europeas al marco legislativo español hasta la fecha, lo que evidencia el intento de compatibilizar al máximo ambas normativas.

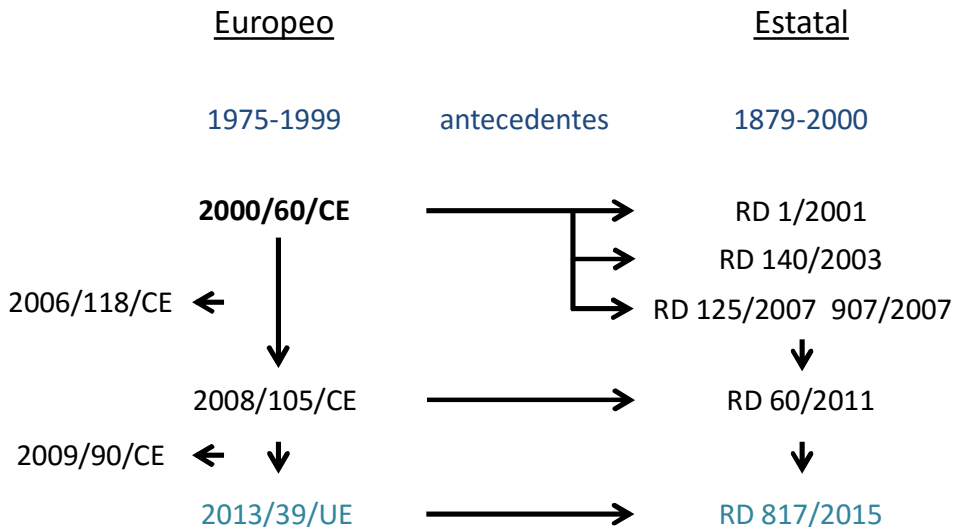


Figura 3. Esquema que muestra las transposiciones hechas hasta el día de hoy de las directivas europeas al marco normativo español.

1.2.3 Nivel autonómico

Así como España intenta adaptar su normativa de acuerdo a las directivas europeas para proteger el agua, la Generalitat Valenciana ha seguido el mismo camino a través de diferentes leyes y de asistencia tanto económica como técnica a las entidades locales pertinentes. Algunas medidas emblemáticas han sido tomadas en los últimos años:

1986. Se estableció la primera norma autonómica en donde se hace alusión a la necesidad de controlar el uso y aprovechamiento hídricos: Ley 7/1986, de 22 de diciembre, que concierne la utilización de aguas para riego en la Comunidad Valenciana.

1992. Se promulgó la Ley 2/1992, de 26 de marzo, relativa al saneamiento de aguas residuales de la Comunidad Valenciana y amparada por la Directiva 91/271/CEE que normalizaba el tratamiento de aguas residuales urbanas.

2014. Se dictó la Ley 6/2014, de 25 de julio, actualmente en vigor sobre la prevención, calidad y control ambiental de actividades en la Comunidad Valenciana. Esta norma derogó a la Ley 2/2006, de 5 de mayo, relativa a la contaminación y calidad ambiental.

1.3 Matrices Ambientales

Para llevar a cabo el seguimiento o monitorización de un determinado contaminante (e.g. un EC) es necesario comprender su comportamiento en las diferentes matrices medioambientales: agua, aire, suelos, sedimentos y biota. Desde su fuente de emisión hasta el compartimento ambiental receptor (que a su vez puede actuar como fuente de emisión), un contaminante puede ser transportado en el medio ambiente a través de un sinnúmero de procesos y llegar, por ejemplo, a los seres humanos. Estos últimos están expuestos a esta sustancia al realizar acciones tan cotidianas como respirar, beber, comer y/o simple contacto. Dichas fuentes, pueden ser lugares, objetos, actividades o entidades que liberen contaminantes.

El agua es un compartimento ambiental particularmente importante. En ciertas ocasiones, las concentraciones de los contaminantes pueden llegar a ser tan bajas que ni siquiera el más sensible de los instrumentos es capaz de medirlas. Es el caso de algunos POPs. No obstante, éstos pueden bioacumularse en tejidos biológicos de ciertos organismos en el agua (la biota acuática) [30]. Analizar los compuestos en biota, en este caso, puede dar una idea de la contaminación de otra matriz ambiental (en el ejemplo, el agua). Estas estrategias son comunes y pueden ser usadas como cribado inicial de un área determinada para realizar estudios de impacto ambiental.

De lo comentado anteriormente se infiere que conocer las matrices involucradas es fundamental. Un contaminante puede ser transportado y/o transformado y pasar de un compartimento a otro dependiendo de sus características físico-químicas y de las del medio en que se encuentre [31]. Para ilustrar este hecho, se describen los mecanismos de transporte y los procesos de transformación de sustancias en las **Figuras 4 y 5**.

La **Figura 4** muestra los procesos de transporte de un contaminante liberado en el medio ambiente (considerando las 5 matrices ambientales). Como puede apreciarse, el contaminante puede desplazarse en un mismo medio a través de mecanismos de transporte como advección, difusión y dispersión (por ejemplo, tanto en aire como en agua). La advección se define como el arrastre de una sustancia en un fluido en movimiento; por otra parte, la difusión se entiende como el mecanismo de transporte causado por el movimiento aparentemente aleatorio de las partículas; por último, la dispersión corresponde al mecanismo de transporte causado por las fluctuaciones de la velocidad respecto a la media del fluido [32]. Además, dicho contaminante puede pasar de una matriz ambiental a otra por medio de procesos de interfase (e.g. un contaminante en el aire o adsorbido en partículas del mismo puede llegar al suelo por deposición). También, esta sustancia puede pasar de un medio abiótico a uno biótico como se ha mencionado previamente por procesos como biotransferencia o bioconcentración (entendido como un paso desde el medio ambiente a tejidos biológicos de un organismo) [33]. La biotransferencia puede entenderse como el

paso de una sustancia de un organismo a otro sin necesariamente ocurrir una acumulación del mismo [34].

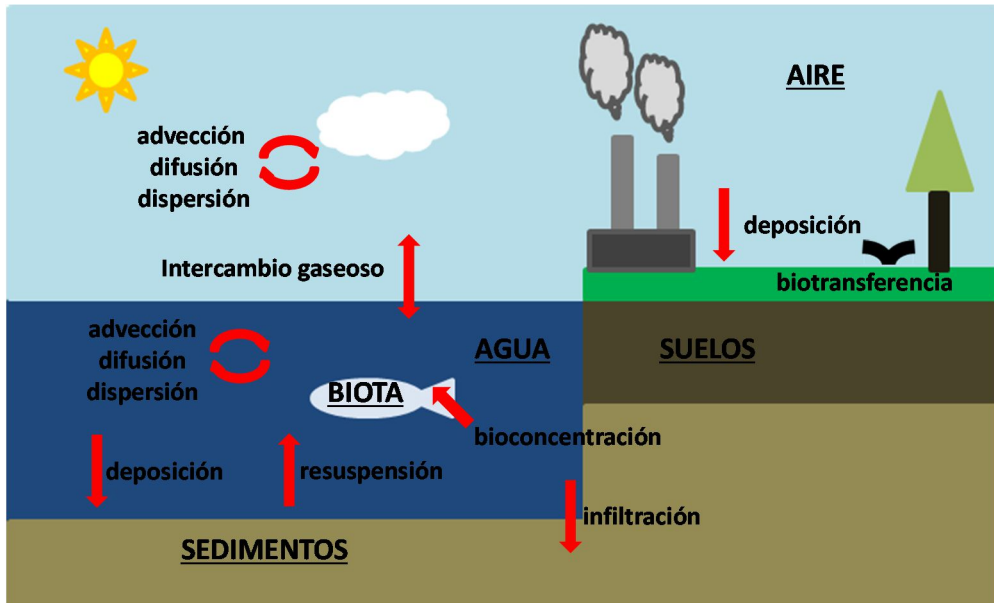


Figura 4. Esquema que muestra los procesos de transporte de un contaminante en las distintas matrices ambientales.

En la **Figura 5** se representan los diferentes procesos de transformación química que pueden tener lugar en un compartimento ambiental. Estos dependen tanto de las propiedades físico-químicas del contaminante (e.g. solubilidad en agua, presión de vapor, reparto) como las características del medio en que se encuentra. A este respecto, factores importantes a tener en cuenta son:

- el clima y la meteorología (precipitaciones, velocidad del viento y tasa de evaporación)
- propiedad del agua (flujo, temperatura y pH)
- propiedades de los suelos y sedimentos (tamaño de partícula, porosidad)
- otros factores (población microbiológica, topografía, etc.)

Entre los procesos que pueden ocurrir en términos simples se encuentran: la fotólisis (reacción con la luz), la hidrólisis (reacción con el agua), precipitación (generación de un sólido), biodegradación (descomposición orgánica) y disolución (formación de una solución acuosa).

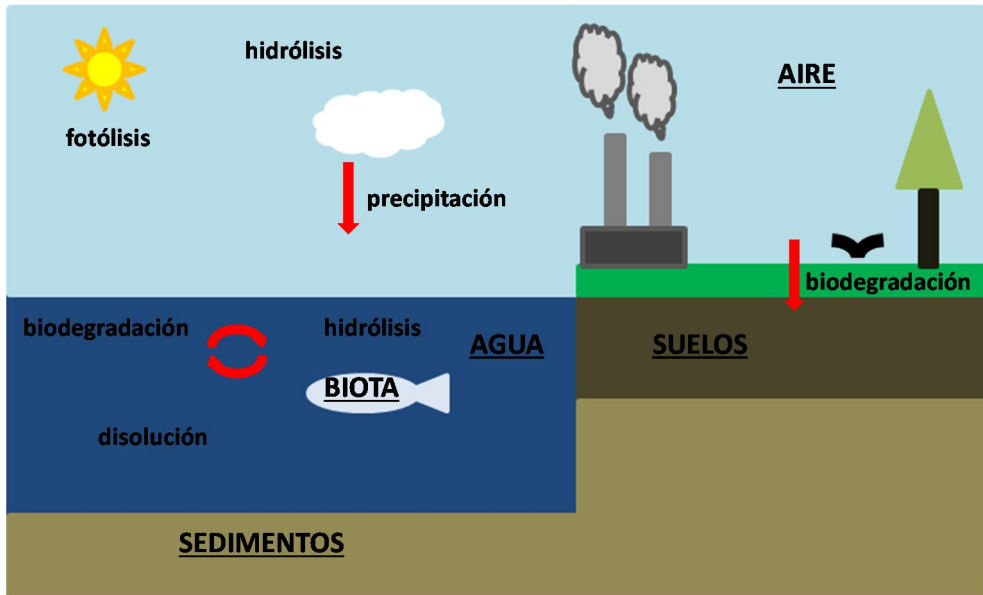


Figura 5. Esquema que muestra los procesos de transformación química de un contaminante en las distintas matrices ambientales.

La contaminación del aire representa en la actualidad el mayor factor de riesgo medioambiental de muerte prematura en Europa [35]. Las cifras de mortalidad relacionadas con la contaminación al aire libre han sido elevadas tanto en países desarrollados como en países del tercer mundo [36]. De estos hechos, se desprende que la mayoría de las personas respira aire que no cumple con los requisitos de calidad de éste establecidos a nivel europeo e incluso a nivel mundial. Siendo un tópico sensible, se requiere una adecuada monitorización de los contaminantes en este compartimento para asegurar una calidad del aire óptima y así prevenir efectos negativos en la salud humana [37], la geografía y el clima del planeta [38]. Los contaminantes del aire pueden afectar a los ecosistemas causando eutrofización, acidificación y destrucción de la vegetación [35].

Las fuentes de la contaminación en el aire pueden tener tanto un origen natural (emisiones volcánicas, incendios, relámpagos, descomposición aeróbica y anaeróbica) como

antropogénico (causadas por la actividad humana). En este último y dependiendo del área, la quema de combustibles fósiles en centrales energéticas, industrias y transporte es la mayor responsable en sectores urbanos; en cambio, en sectores rurales y semiurbanos, la quema de biomasa y el empleo de estufas tradicionales constituyen las fuentes más importantes. Por otra parte, los contaminantes se pueden clasificar en primarios y secundarios dependiendo de si son emitidos directamente desde la fuente o si se originan en la atmósfera en procesos químicos.

Especialmente importantes en este tema son las partículas del aire (PM) consideradas como las responsables de la mayoría de los riesgos en cuanto a salud [39]. Estas PM se clasifican dependiendo del tamaño: $PM_{2.5}$ y PM_{10} que poseen diámetro inferior a 2.5 micras y de 2.5 a 10 micras respectivamente. Las partículas más finas se componen de contaminantes orgánicos volátiles (VOCs), metales pesados, entre otros compuestos. La toxicidad de las $PM_{2.5}$ es elevada ya que son más persistentes, viajan a mayores distancias en menos tiempo y penetran en los pulmones con mayor facilidad [40]. Otros contaminantes como el benzo(a)pireno (BaP), indicador para los PAHs, suscitan interés debido a su elevada toxicidad (efecto carcinogénico [41]), requiriendo el desarrollo de nuevos métodos de seguimiento en esta matriz ambiental [42].

Como se ha comentado, mantener la calidad del agua, recurso indispensable para la vida, es prioridad en las políticas de protección ambiental de la Unión Europea. Claro ejemplo de esto han sido las diferentes directivas (destacando la DMA) adoptadas hasta la fecha que velan por la integridad de los distintos tipos de agua: aguas superficiales, subterráneas y residuales. Directamente relacionado con esta normativa, se encuentra el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan monitorizar los contaminantes alcanzando una mayor sensibilidad y utilizando procesos que respeten el medio ambiente (miniaturización, menor uso de solventes y reactivos tóxicos) [43]. Tradicionalmente, las investigaciones en torno a la calidad del agua, se enfocaban en analizar nutrientes, bacterias, metales pesados y contaminantes prioritarios. No obstante, estudios recientes revelan la alta ocurrencia de ECs en aguas superficiales por ejemplo [44].

El agua presenta una constante movilidad en el planeta. La **Figura 6** respalda este hecho mostrando el ciclo del agua. Los contaminantes que lleguen hasta ella en un punto podrían eventualmente desplazarse. En el denominado ciclo urbano del agua, las EDARs devuelven agua “degradada” al ciclo urbano. Sumado a esto, el crecimiento poblacional y el desarrollo pueden alterar ciertas etapas del ciclo del agua: ejemplificando, más concreto en los suelos significa menos infiltración y por lo tanto, las lluvias ven dificultado su paso a las aguas subterráneas; por otra parte, las escorrentías urbanas de agua aumentan y pueden contaminar otras masas de agua y compartimentos ambientales [45]. Por lo tanto, los estudios de seguimiento de los contaminantes son altamente necesarios.

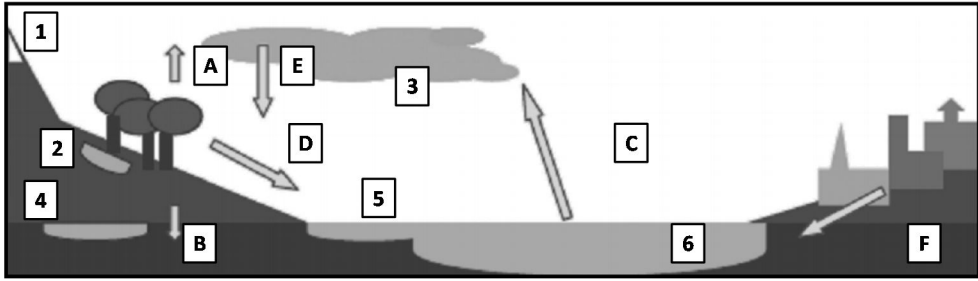


Figura 6. Representación del ciclo del agua. Las masas de agua consideradas: (1) hielo, (2) agua edáfica, (3) agua atmosférica, (4) agua subterránea, (5) agua superficial y (6) agua salada. Los procesos involucrados: (A) transpiración, (B) infiltración, (C) evaporación, (D) escorrentía, (E) precipitación y (F) contaminación.

Las aguas superficiales comprenden diferentes categorías: ríos, lagos, aguas de transición, aguas costeras, masas de agua artificial y modificadas [27]. Despiertan un gran interés debido a que una parte del agua potable (que crece con el tiempo) se prepara a partir de ellas. En Europa, los grandes ríos (Danubio, Mosa, Rin, Tajo, entre otros) suplen las necesidades en gran medida. Los contaminantes que pueden afectar a estas aguas provienen en su mayoría de actividades humanas tales como agricultura, industria, transporte y menaje [46].

Si de agua potable se refiere, la fuente mayoritaria corresponde a las aguas subterráneas. Aproximadamente un 65% del agua potable se obtiene a partir de ellas [47]. Por lo tanto, la contaminación de las mismas genera mucha preocupación y a su vez, es poco conocida en comparación con la que se tiene en otras masas de agua (superficiales y residuales) [48]. Los sistemas sépticos de tratamiento de agua residual constituyen una amenaza para las aguas subterráneas [49], así como las filtraciones en los alcantarillados [50]. También, la infiltración de agua marina y la existencia de tanques subterráneos para almacenar sustancias tóxicas pueden contribuir a la contaminación de las aguas subterráneas, que históricamente han poseído una elevada calidad química y bacteriológica (i.e. bajos niveles de bacterias) en comparación con el resto de las masas de agua [46].

Las aguas residuales son la mayor fuente de ECs en el medio ambiente [51]. Dichas aguas contienen microorganismos, compuestos disueltos y en suspensión tanto de naturaleza orgánica, inorgánica y organometálica [52]. El seguimiento es extensivo. Para ejemplificar, se realizan análisis de ECs tanto en influentes como en efluentes de aguas residuales tratadas en las EDARs para determinar el rendimiento de eliminación de estas plantas [53] o bien en estudios comparativos de determinación de ECs en aguas de beber, superficiales, subterráneas y residuales, siendo estas últimas las que contenían mayores concentraciones de contaminantes [54].

El término biota designa a la totalidad de los organismos vivos (flora y fauna) en una determinada región o tiempo. Algunos de ellos, pueden servir para evaluar la calidad del medio ambiente y cómo cambia ésta temporalmente. A estos últimos se les llama bioindicadores (el término también es aplicado para procesos biológicos y comunidades) y su uso en los estudios ambientales (que reciben el nombre de biomonitorización) constituye una estrategia ampliamente adoptada [55] e incluso sugerida por las directivas europeas [13, 56]. Sensibles a las características físico-químicas de su entorno, estos organismos son capaces de acumular los contaminantes (proceso denominado bioacumulación, descrito en secciones previas), lo que permite llevar a cabo estudios ambientales de ecotoxicología y evaluación de riesgos [57]. Además, permiten hacerse una idea del grado de contaminación del compartimento ambiental en donde habitan.

Por lo anteriormente expuesto, se puede comprender que, en los últimos cincuenta años, muchas sustancias analizadas habitualmente constituyan POPs como bifenilos policlorados (PCBs), hexaclorociclohexanos, entre otros [58]. Sin embargo y por la escasa información al respecto, los análisis de ECs en biota han aumentado con el correr de los años: estudios sobre efectos en organismos y destino de dichas sustancias, sus metabolitos y productos de transformación, así como mezclas de éstas son el objeto de una intensa investigación en la actualidad [57].

La contaminación de los suelos no sólo es un problema de los países industrializados. Además de las sustancias químicas orgánicas e inorgánicas de origen antropogénico que pueden alcanzar esta matriz ambiental, existen contaminantes de origen natural, fruto de las fuentes radiológicas terrestres y los desechos (nutrientes y bacterias patógenas) producidos por animales y vegetales (esto también afecta a los sedimentos). Sumado a esto, en algunos países los suelos son utilizados como depósitos de basura industrial, militar y urbana. Aquí, los contaminantes por filtración pueden llegar al resto de los compartimentos ambientales. Por otra parte, algunas sustancias (e.g. pesticidas) pueden ser directamente aplicadas sobre el suelo o depositarse desde el aire. Por lo tanto, las vías de contaminación son numerosas, haciendo que las medidas de protección, estudios ambientales y tareas remediativas adquieran protagonismo en muchos países [59].

Los suelos constituyen la parte superficial de la litósfera y son matrices complejas: además de agua y aire, la mayor fracción es de naturaleza inorgánica (arena, limo y arcilla) y una menor corresponde a la materia orgánica del suelo (SOM), i.e., organismos y microorganismos (vivos o muertos) en diferentes etapas de descomposición. La importancia de la SOM radica que los contaminantes más apolares (e.g. POPs) pueden ser fuertemente retenidos en ella a diferencia de las interacciones que pueden darse en otras matrices ambientales. Esto hace que la etapa de extracción del suelo de estas sustancias se convierta en una etapa crucial para realizar un seguimiento adecuado [59]. Los ECs (e.g. PPCPs)

pueden alterar las propiedades físico-químicas y biológicas de los suelos [60]. En este ámbito, los biosólidos representan una ruta importante de contaminación [61]. Estos compuestos son residuos orgánicos sólidos, semisólidos o líquidos que resultan del tratamiento de las aguas residuales procesadas en las EDARs y que debido a su alto valor nutricional pueden ser utilizados para agricultura y jardinería.

Así como los suelos, los sedimentos contienen una fracción mineral y otra de naturaleza orgánica (que suele ser menor que en suelos) encontrándose en las profundidades de masas de agua natural tales como lagos, ríos y océanos. La contaminación de los sedimentos se produce principalmente por deposición desde la columna de agua (proceso que recibe el nombre de sedimentación). En determinado ambiente acuático y como se ha discutido para la biota, los sedimentos pueden acumular OCs (e.g. PAHs) actuando como sumidero y portador de contaminantes, poniendo en riesgo a los organismos marinos y presumiblemente a todos los niveles tróficos de la cadena alimenticia marina [62]. El ser destino primero, y luego fuente, de sustancias tóxicas presupone un problema serio en el caso de la contaminación de aguas: no sólo bastaría con controlar las emisiones de otras fuentes y habría que remediar los sedimentos (en contacto directo con las aguas) lo que supone una tarea complicada [63].

Al igual que la biota marina, el análisis de sedimentos es una estrategia que se puede adoptar para el seguimiento de contaminantes en el medio ambiente, sobre todo en aguas [64]. Es más, dependiendo de la profundidad en la que se ubiquen dichos contaminantes, se pueden obtener conclusiones temporales y así, tomar medidas preventivas en materia de protección medioambiental. La normativa europea sugiere el estudio de contaminantes (lo que se puede extender a ECs) en sedimentos para una monitorización más completa de los mismos en el medio ambiente [13].

De la lectura de este apartado se deriva que es necesario el desarrollo de nuevo conocimiento sobre el medio ambiente en general y en particular en técnicas de análisis de coste efectivo, es decir que se adecuen al problema a resolver en su conjunto y considerando todas las variables: número y tamaño de muestras, información a obtener, rapidez de respuesta, autonomía necesaria, complejidad, residuos generados, sostenibilidad, resiliencia, entre otras.

1.4 Microextracción en fase sólida en tubo acoplada a técnicas cromatográficas

En el desarrollo de nuevas metodologías más respetuosas con el medio ambiente, la microextracción en fase sólida (SPME) se perfila como una técnica atractiva en cuanto a preparación de muestras se refiere ya que respeta los principios básicos de una química más sostenible [65]:

- disminuye el consumo de disolventes y de reactivos (en ocasiones, sustancias tóxicas)
- reduce la generación de residuos (muchas veces, nocivos)
- requiere menos tiempo (mayor eficiencia)
- el coste es menor

En este contexto el término de “microextracción” hace referencia al volumen o masa de fase extractiva utilizado en el procedimiento de preparación de muestra (en el rango de los microlitros o microgramos). Dicha fase puede ser inmovilizada en diferentes dispositivos tales como fibras, filtros u otras superficies, o incluso puesta en contacto directo con la muestra. El volumen de muestra procesado suele ser elevado en comparación con la cantidad de fase extractiva. Dependiendo de si esta fase es un material (de naturaleza polimérica por lo general) sólido o semisólido, la técnica de extracción recibe el nombre de SPME.

Introducida por Pawliszyn y sus colaboradores [66], la SPME consigue, por una parte, miniaturizar la etapa de preparación de la muestra y por otra, acoplar el muestreo, la extracción y la preconcentración en una sola etapa (minimizando con ello, el uso de disolventes). De las diferentes variantes de la SPME, aquéllas que emplean columnas capilares para la extracción poseen ventajas adicionales como, por ejemplo, la automatización y acoplamiento en línea con el método utilizado de separación y/o detección.

En las técnicas de SPME que utilizan columnas capilares, la extracción y preconcentración de los analitos tienen lugar por adsorción o absorción de éstos en la superficie de las columnas mencionadas, a su vez acopladas a un sistema cromatográfico. Existen dos variantes principales dependiendo de la naturaleza de dicho sistema cromatográfico: por un lado, columna tubular abierta de atrapamiento (OTT) si se acopla a cromatografía de gases (GC); por otro, microextracción en fase sólida en tubo (IT-SPME) si se trata de LC [67].

La IT-SPME fue desarrollada como alternativa a la SPME original que utiliza fibras recubiertas de un material extractivo, las cuales presentan fragilidad mecánica y dificultad para ser acopladas a un sistema de cromatografía líquida, así como una pequeña dimensión

de los recubrimientos. En la IT-SPME, el material extractivo está inmovilizado como recubrimiento o relleno de una columna capilar acoplada al cromatógrafo. Son muy utilizados los segmentos de las columnas capilares de GC, que existen en una amplia gama de tipos con variadas fases estacionarias para el análisis de compuestos de diferente polaridad.

Además de permitir que la extracción, preconcentración, separación y detección se puedan llevar a cabo en una sola etapa, la IT-SPME acoplada a LC (IT-SPME-LC) reduce los tiempos de análisis, así como mejora parámetros analíticos tales como la exactitud y la precisión en relación con técnicas de extracción manual. Por estos motivos, esta técnica ha sido utilizada en diversas variantes en la presente Tesis con el fin de caracterizar y analizar algunos ECs.

1.4.1 Acoplamiento a LC

La IT-SPME-LC presenta dos modalidades de trabajo: carga/expulsión e IT-SPME en válvula. En la primera [68], los capilares con las fases extractivas se conectan entre la aguja y el bucle (loop) de un inyector automático programable. Los analitos se extraen mediante ciclos de carga/expulsión de la disolución de muestra al capilar, para luego ser desorbidos y transferidos a la columna analítica por medio de una fase móvil apropiada.

La IT-SPME en válvula es la modalidad en donde la columna capilar se emplea como loop de una válvula de inyección. En la **Figura 7** se muestra un esquema simple de esta configuración, así como también la columna capilar acoplada a la válvula de inyección. Los analitos son extraídos en el proceso de carga de la muestra y al momento de cambiar de posición la válvula, son transferidos hacia la columna analítica. Existen dos modos de realizar el proceso de desorción: estático y dinámico. En el primero, los analitos se desorben inyectando un disolvente adecuado para luego ser transportados por la fase móvil al resto del sistema cromatográfico [69]; en cambio, en el modo dinámico, es la propia fase móvil quien se encarga de desorber los analitos [70]. En general, el modo estático se emplea cuando el material adsorbente retiene fuertemente a los analitos.

Una de las principales ventajas de la IT-SPME en válvula, que hace de ella una técnica adecuada para el análisis de OCs y ECs en aguas (matriz en donde se necesita una elevada sensibilidad), es que permite procesar grandes volúmenes de muestra a través de la columna capilar (i.e. con múltiples llenados del loop) independiente de que la eficiencia de extracción (o recuperación absoluta) pueda ser baja. Con una simple operación manual, se pueden mejorar los parámetros analíticos y así llegar al nivel de sensibilidad requerido. Por otra parte, existe una línea de investigación abierta que pretende incrementar la eficiencia de extracción de los capilares (considerada como la mayor desventaja de las técnicas que hacen

uso de la IT-SPME) a través del desarrollo de nuevos materiales adsorbentes (e.g. materiales poliméricos y nanomateriales) y el uso de propiedades físicas (e.g. el magnetismo) [71].

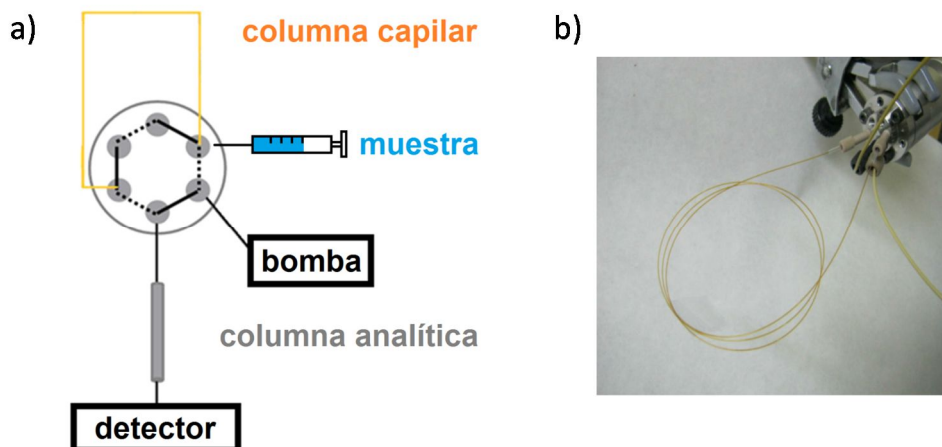


Figura 7. a) Representación esquemática de la IT-SPME en válvula con sus diferentes componentes. b) Columna capilar acoplada a la válvula de inyección de un sistema de LC.

La eficiencia de extracción está relacionada con la afinidad del analito por la fase extractiva y depende de varios parámetros, entre los cuales destacan la naturaleza y el espesor del adsorbente de la columna capilar, las dimensiones de ésta (longitud y diámetro interno, i.d.), así como del pH y del volumen de muestra [72]. Además, el tipo de sistema cromatográfico acoplado juega un rol fundamental ya que presupone una configuración espacial determinada, teniendo incidencia en los parámetros analíticos. La tendencia a miniaturizar los sistemas supone el desarrollo del acoplamiento de IT-SPME con técnicas cromatográficas de menor dimensionalidad (e.g. cromatografía líquida capilar (Cap-LC) y nanocromatografía líquida (nano-LC)).

En la actualidad, el acoplamiento entre la IT-SPME y HPLC está bien resuelto. Se han descrito metodologías basadas en la IT-SPME-HPLC con detección UV-Vis (convencional y con detección de fila de diodos, DAD) [73,74], de fluorescencia (FLD) [75] y de espectrometría de masas (MS) [76] aplicadas a muestras medioambientales, industriales y biológicas para el análisis de OCs y ECs. En algunos casos, es necesario derivatizar los analitos, operación que se puede realizar en línea y de manera sencilla añadiendo sucesivamente el agente derivatizante y la muestra dejando el tiempo necesario para que se lleve a cabo la reacción [75].

1.4.2 Acoplamiento a sistemas miniaturizados

El grupo de investigación Miniaturización y Métodos Totales (MINTOTA) en el que se ha desarrollado la presente Tesis se especializa, entre otros, en el desarrollo de metodologías que involucran el acoplamiento de la IT-SPME con LC miniaturizada (principalmente IT-SPME-Cap-LC, aunque recientemente IT-SPME-nano-LC). Cabe mencionar que MINTOTA viene contribuyendo con esta técnica (también en su variante IT-SPME-HPLC) desde el año 2006. En el presente, el acoplamiento con Cap-LC está consolidado, siendo el más utilizado en la presente Tesis. En cuanto a nano-LC, en este trabajo se logra desarrollar de forma pionera un método basado en la IT-SPME-nano-LC para el análisis de fármacos (e.g. diclofenaco) en muestras de agua.

Tabla 2. *Parámetros operacionales y dimensiones empleadas en el acoplamiento IT-SPME con sistemas miniaturizados.*

Parámetro	IT-SPME-Cap-LC	IT-SPME-nano-LC
i.d. columna capilar (μm)	100-320	10-300*
i.d. columna analítica (μm)	200-500	10-150
flujo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	4-20	0.2-1

*valores reportados en la bibliografía, el i.d. suele ser $\leq 100 \mu\text{m}$

El interés por el acoplamiento IT-SPME con sistemas miniaturizados radica en que la eficiencia de la columna y la sensibilidad se ven incrementadas (la muestra inyectada no se diluye en el sistema comparado a HPLC por ejemplo), al mismo tiempo que se reduce el uso de disolventes [77]. Los parámetros operacionales del sistema involucrado y las dimensiones son factores cruciales a tener en cuenta para conseguir tanto el IT-SPME-Cap-LC como el IT-SPME-nano-LC [78]. En la **Tabla 2** se muestran algunos de ellos.

1.4.3 Materiales adsorbentes

El material más utilizado como fase extractiva en la técnica de IT-SPME en válvula es el polidimetilsiloxano (PDMS) [79]. Se trata de un polímero de la familia de las siliconas constituido por cadenas flexibles de unidades $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$. Es un material transparente, no es tóxico, ni reactivo con la mayoría de los productos químicos, ni bioacumulable [80]. Se caracteriza por ser hidrofóbico absorbiendo muy poco los disolventes hidrofílicos con los que entra en contacto. En estas condiciones, se produce un transporte de los compuestos que pueden encontrarse en estos disolventes hacia el PDMS quedando adsorbidos. Por lo tanto, el PDMS es una fase extractiva idónea para la IT-SPME acoplada a LC en fase reversa.

El PDMS recubre la pared interna de capilares que se comercializan como columnas para GC presentando un porcentaje variable de polidifenilsiloxano (expresado como TRB, usualmente entre 5-35%). Los capilares (PDMS-TRB o PDMS TRB) se adaptan para ser utilizados en IT-SPME como ya se ha comentado. El inconveniente del PDMS es que las eficiencias de extracción de los analitos suelen ser bajas y por lo tanto, este parámetro ha sido concebido como el punto débil de la técnica IT-SPME [71]. Como consecuencia de ello, mejorar la eficiencia de extracción de compuestos de interés se ha convertido en una tendencia de investigación y esto se puede lograr funcionalizando los capilares o bien, sintetizando nuevos materiales adsorbentes. Es en este campo donde, además de los polímeros, los nanomateriales (sección 1.5.3) presentan características interesantes que hacen de ellos buenos adsorbentes (la **Figura 8** muestra como al funcionalizar capilares comerciales de PDMS-TRB-35 con nanotubos de carbono, CNTs, se mejora la adsorción de los PAHs analizados).

De entre ellos, las nanopartículas (NPs) han sido ampliamente utilizadas, lo que ha llevado a la creación del concepto “microextracción con NPs”. Este término hace alusión al procedimiento de microextracción en donde la fase extractiva contiene NPs (concepto extendible a nanomateriales), pudiendo ser añadidas directamente a las muestras (como en la microextracción en fase sólida dispersiva, DSPME) o inmovilizadas en una fibra (e.g SPME en fibra) o bien en la superficie interna de un capilar (e.g. IT-SPME). Los procedimientos de extracción pueden estar o no acoplados al sistema de separación/detección (en línea o fuera de línea respectivamente). Para más información, ver el Anexo 5.

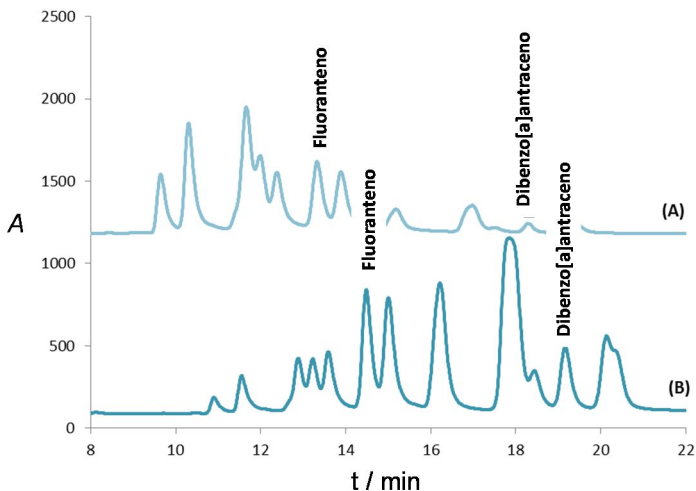


Figura 8. Cromatogramas obtenidos para una mezcla de PAHs (100 $\mu\text{g/L}$) en IT-SPME en válvula acoplado a Cap-LC utilizando: a) un capilar de PDMS-TRB-35, b) un capilar de PDMS-TRB-35 modificado con CNTs.

Las 4 tipos de adsorbentes que involucran NPs son materiales a base de:

- NPs metálicas: principalmente de oro, plata y óxidos metálicos (TiO_2 , ZnO , ZrO_2 , entre otros) utilizados como adsorbentes por su alta capacidad extractiva, estabilidad y en algunos casos, selectividad. Son altamente funcionalizables.
- NPs magnéticas: poseen núcleos magnéticos, típicamente de óxido de hierro (Fe_3O_4), incrustadas en matrices de sílice o poliméricas. Ofrecen una alta capacidad extractiva y en su caso, pueden ser separadas fácilmente después de la extracción por medio de un imán.
- NPs de sílice: se usan generalmente para preparar adsorbentes de nanoestructuras híbridas o composites que pueden ser funcionalizadas con facilidad a través de los grupos silanoles (e.g. NPs magnéticas recubiertas de sílice).
- CNTs: hojas laminares de grafito enrolladas en un solo tubo (CNTs de pared simple o SWCNTs). Si existen varios tubos sellados concéntricos unidos entre sí, se trata de CNTs de pared múltiple (MWCNTs). Son fácilmente funcionalizables, con excelente capacidad adsorptiva para una amplia gama de compuestos.

En la presente Tesis, se emplearon capilares comerciales de PDMS y otros que poseían una fase extractiva híbrida con nanomateriales recubiertos de sílice o polímeros funcionalizados con éstos para la técnica de IT-SPME en válvula (en línea) acoplada a LC (HPLC, Cap-LC y nano-LC). Cabe destacar un nanomaterial híbrido desarrollado por MINTOTA en conjunto con el Equipo de Investigación en Material Molecular (RTMM), compuesto por NPs esféricas de Fe_3O_4 y micelas de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) incrustadas en una matriz de sílice (SiO_2) [81], que se ha empleado con éxito en el desarrollo de métodos de determinación de ECs y otros contaminantes. Una particularidad del nanomaterial en cuestión es que posee NPs magnéticas por lo que puede ser utilizado en línea en la IT-SPME Magnética [71] o bien fuera de línea en extracción en fase sólida magnética (MSPE) mostrando que los materiales magnéticos son buenos adsorbentes de OCs [82]. En la **Tabla 3**, se indican algunas aplicaciones [83-88] de los adsorbentes basados en NPs magnéticas en procedimientos fuera de línea para determinar compuestos químicos en matrices complejas (e.g. biológicas) que son pruebas adicionales de este comportamiento.

La **Tabla 4** muestra algunas metodologías [71,74,79,89-93] de IT-SPME en válvula y acoplada en línea a LC o GC que utilizan capilares con diferentes adsorbentes en los últimos 10 años. La variedad de analitos es amplia incluyendo ECs y contaminantes prioritarios, entre otros OCs.

Tabla 3. Aplicaciones en procedimientos fuera de línea de nanomateriales con NPs magnéticas en análisis de muestras biológicas

Nanomaterial Magnético	Analito	Muestra	Técnica	LOD (ng/L)	Rec. (%)	Ref.
Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /base de Schiff	Pb, Cd, Cu	pelo humano	ICP-OES	120-190	97.8-102.9	[83]
Fe ₃ O ₄ /TEOS/difemilo	PAHs	orina	GC-MS	0.04-0.39	81-93	[84]
Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /PAHIP y TRA ^a	Tramadol (TRA)	orina	UV-Vis	1500	96.1-100.1	[85]
Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /C ₁₈	Puerarin	plasma de rata	HPLC-UV	0.01	93.6-95.3	[86]
Fe ₃ O ₄ /PS-DVB	Fenitroton	plasma humano	UV-Vis	500	98.5-101.5	[87]
Fe ₃ O ₄ /CTAB	Ácido Mefanámico	plasma humano	HPLC-UV	97	89-99	[88]
		orina		87	96-103	

^a como molde

LOD límite de detección, *LOQ* límite de cuantificación, *Rec.* Recuperación, *Ref.* Referencia, *ICP-OES* espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo, *TEOS* tetraetilortosilicato, *PAHs* hidrocarburos aromáticos policíclicos, *GC* cromatografía de gases, *MS* espectrometría de masas, *PAIHP* homopolímero de poliaminoimida, *UV-Vis* espectrofotometría UV Visible, *HPLC* cromatografía líquida de alta resolución, *PS-DVB* poli(estireno-divinilbenceno), *CTAB* bromuro de cetiltrimetilamonio

Tabla 4. Materiales adsorbentes empleados en capilares para IT-SPME en válvula acoplado en línea con cromatografía

Año	Adsorbente IT-SPME	analito	muestra	técnica	Ref.
2005	PDMS 100%	PAHs	aguas	IT-SPME-GC-MS	[89]
2006	PDMS 100%	triazinas	aguas	IT-SPME-Cap-LC-UV	[90]
2008	PDMS-TRB 5	residuos de aminas primarias	polímeros catiónicos ¹	IT-SPME-HPLC-DAD	[91]
2009	PDMS-TRB 5	residuos de aminas secundarias	polímeros catiónicos ¹	IT-SPME-HPLC-DAD	[74]
2010	PDMS-TRB 5	PAHs, pesticidas, ftalatos, fenoles	aguas	IT-SPME-Cap-LC-DAD	[79]
2012	Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	AAS, acetaminofeno, atenolol, Diclofenaco, ibuprofeno	aguas	Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD	[71]
2015	PDMS-TRB 5 SWCNTs PDMS-TRB 5 MWCNTs	triazinas y derivados polares	aguas	IT-SPME-Cap-LC-DAD	[92]
2015	PDMS-TRB 5 CNTs PDMS-TRB 35 CNTs	PAHs, triazinas, OPs, piretroides	aguas	IT-SPME-Cap-LC-DAD	[93]

¹utilizados en el tratamiento de aguas

IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo, *Ref.* referencia, *PDMS* polidimetilsiloxano, *PAHs* hidrocarburos policíclicos aromáticos, *GC* cromatografía de gases, *MS* espectrometría de masas, *Cap-LC* cromatografía líquida capilar, *UV* ultravioleta, *TRB* porcentaje de polidifensiloxano, *HPLC* cromatografía líquida de alto rendimiento, *DAD* detector de fila de diodos, *AAS* ácido acetilsalicílico, *Magnetic-IT-SPME* microextracción en fase sólida en tubo magnética, *SWCNTs* nanotubos de carbono de pared simple, *MWCNTs* nanotubos de carbono de pared múltiple, *CNTs* nanotubos de carbono, *OPs* compuestos organofosforados,

1.5 Sustancias analizadas

En esta Tesis, el estudio se ha centrado en los ECs en diferentes compartimentos ambientales. Sin embargo y teniendo en cuenta su definición, se han analizado además sustancias prioritarias que pertenecen a familias que han sido objeto de estudio desde hace varios años. Se han seleccionado como analitos diana en metodologías que se podrán extender a otras sustancias (en una misma familia, metabolitos, derivados o productos de transformación) y/o ECs. Se ha dividido el trabajo por familias de contaminantes.

1.5.1 Fármacos

Los fármacos son compuestos químicos usados para el diagnóstico, tratamiento o prevención de enfermedades en humanos y animales. Es imposible concebir la sociedad actual sin estos compuestos, los cuales son producidos en proporciones masivas anualmente por todo el mundo, producción que sigue creciendo debido al envejecimiento de la población, para prevenir en vez de curar enfermedades y su uso como aditivo en comidas [46].

Las vías principales de los fármacos para alcanzar el medio ambiente son la metabolización y excreción en organismos, un tratamiento incompleto en las EDARs con lo que se propagan por los efluentes correspondientes (y en biosólidos), su eliminación directa a alcantarillado y basura sin haber sido utilizados [94]. Después de ser ingeridos, los ingredientes farmacéuticos activos (APIs) sufren procesos metabólicos en un determinado organismo. Los metabolitos resultantes (activos o inactivos), así como las formas sin metabolizar son excretados, llegando como contaminantes traza al alcantarillado y luego a las EDARs. Esto presupone que es necesario desarrollar métodos de alta sensibilidad y que permitan analizar tanto APIs como metabolitos.

Entre las clases de fármacos más utilizadas [95], se encuentran:

- Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs): utilizados para tratar el dolor agudo y la inflamación, pueden ser administrados por vía oral o tópica, necesitando prescripción médica o no. No son muy persistentes, pero su elevado uso provoca que se encuentren repartidos por el medio ambiente. En las EDARs, su concentración baja significativamente luego del tratamiento, pero no deja de ser despreciable. Ejemplos emblemáticos son el diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno y el naproxeno.
- Antibióticos: destinados al tratamiento de enfermedades e infecciones causadas por bacterias en humanos y animales, se prescriben con mucha frecuencia. Debido a su baja metabolización, su presencia está extendida por el medio ambiente. Entre los grupos de antibióticos usados en medicina y veterinaria, se encuentran los betalactámicos, los

macrólidos, las sulfonamidas, las fluoroquinolonas y las tetraciclinas. Un caso emblemático es el de la eritromicina, que por riesgos para la salud y ocurrencia en aguas fue incluida por la USEPA en la lista de contaminantes candidatos para ser prioritarios en aguas de beber [96] y en la primera lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento en la UE junto con otros dos macrólidos (azitromicina y claritromicina) [97].

- Antiepilépticos: utilizados para el tratamiento de la epilepsia, neuralgia del trigémino y algunos trastornos psiquiátricos. Uno de estos compuestos, la carbamazepina es ampliamente consumida y luego de su ingesta, es metabolizada en casi su totalidad. Los metabolitos resultantes son excretados en la orina. En las EDARs, este antiepiléptico y sus respectivos metabolitos no son completamente eliminados por lo que alcanzan las distintas matrices del medio ambiente (aguas subterráneas y superficiales, suelos).

- Beta-bloqueantes: drogas prescritas para tratar problemas cardiovasculares, de baja persistencia, pero ubicuos en el medio ambiente por su uso elevado (al igual que los NSAIDs). Por su baja capacidad de adsorción y elevada biodegradabilidad, se encuentran mayoritariamente en aguas. Los tratamientos convencionales de las EDARs no consiguen eliminarlos eficazmente. Algunos ejemplos son el atenolol, metoprolol y propranolol.

- Antagonistas de receptores H₂: destinados a tratar las úlceras pépticas y el reflujo gastroesofágico mediante bloqueo de la acción de la histamina. En algunos países, son vendidos sin prescripción médica. La cimetidina y la ranitidina son algunos de los antagonistas H₂ más utilizados y que suelen ser encontrados en aguas residuales.

- Drogas reguladoras de lípidos: utilizadas para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares. De entre ellas, las estatinas son fármacos para disminuir los niveles de colesterol que han visto crecer su uso en los últimos años. Perteneciente a otro grupo de sustancias reguladoras de lípidos, el clofibrato, que disminuye los niveles de triglicéridos en sangre, es uno de los contaminantes más persistentes que se conocen (alrededor de 21 años en el medio ambiente). Estos compuestos se han detectado en aguas residuales sin tratar y después del tratamiento en las EDARs (por ejemplo, el clofibrato no se elimina eficientemente), así como en aguas superficiales.

- Otros fármacos: antidiabéticos, antidepresivos, agentes de radiocontraste, etc.

En los últimos años, los fármacos son los ECs que han generado una mayor preocupación: su consumo en los países de la UE se cifra en toneladas por año y algunos se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas [98]. En la presente Tesis, se ha analizado el diclofenaco de la familia de los NSAIDs.

1.5.1.1 Diclofenaco

Este fármaco es de especial importancia en el estudio de los ECs y ha sido incluido en la primera lista de observación de la normativa europea debido a sus potenciales riesgos y producción elevada [97]. Una evidencia del creciente interés por esta sustancia lo aporta la evolución del número de citas sobre el diclofenaco en el medio ambiente en los últimos diez años (ver **Figura 9a**). En la **Figura 9b** se aprecia la estructura química de este contaminante (su nombre sistemático es ácido 2-(2,6-dicloroanilino)fenilacético).

La investigación científica ha confirmado la presencia del diclofenaco en las diferentes matrices ambientales. Por ejemplo, en la **Tabla 5** se pueden observar las concentraciones de diclofenaco y de otros productos farmacéuticos en aguas residuales de algunos países del mundo (datos recabados de la bibliografía [53,99,100]). España presenta la segunda concentración más alta de diclofenaco en aguas residuales, así como la máxima para ibuprofeno y atenolol.

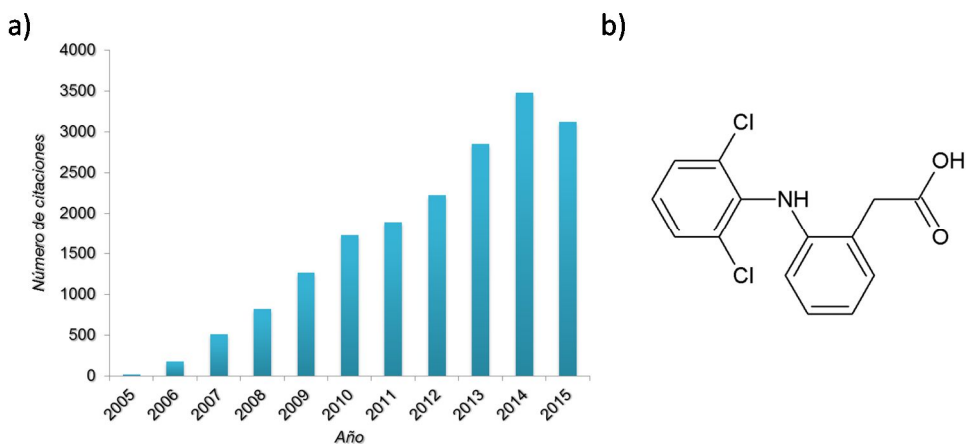


Figura 9. a) Evolución en el número de citas sobre diclofenaco en el medio ambiente desde el año 2005. Fuente Web of Science (Diciembre 2015). b) Estructura química del diclofenaco.

En cuanto a características físico-químicas se refiere, el diclofenaco es una sustancia que posee baja persistencia en el medio ambiente debido a que se atenúa naturalmente y con rapidez mediante fotólisis y biodegradación. Esto implica que se pueden realizar tratamientos de fotodegradación con UV (eliminación de un 30-70%) y otros procesos tales

como ozonización y cloración para remediar aguas (aunque los productos resultantes pueden ser tóxicos, requiriendo más estudios al respecto) [48]. En cualquier caso y como ya se ha dicho, la presencia de este contaminante en las matrices ambientales viene de la mano con el alto volumen de producción y consumo del mismo. Ilustrando este hecho, se han determinado concentraciones de diclofenaco de 11-82, 21-41 y 1.1-6.8 ng/L en aguas de canales y ríos de agua dulce de América del Norte, Europa y Asia-Australia respectivamente.

Tabla 5. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de algunos productos farmacéuticos medidos en aguas residuales en distintos países del mundo. ND representa una concentración por debajo del límite de detección (LOD). Datos extraídos de [53,99,100].

País	atenolol	cafeína	carbamazepina	diclofenaco	ibuprofeno
Alemania	ND	ND	2.1	0.81	0.37
Canadá	ND	17	ND	ND	5.2
Corea	0.6	0.25	0.16	0.1	0.27
EEUU	ND	4.9	0.1	0.02	ND
España	6.2	ND	ND	3.4	14.7
Francia	ND	ND	1.2	0.41	1.82
Grecia	ND	ND	1.03	0.89	0.05
Italia	ND	ND	0.5	5.45	0.18
Suecia	ND	ND	0.87	ND	7.11
Suiza	ND	ND	6.3	2.1	2.1

Otras características físicas del diclofenaco (como las de otros NSAIDs) se pueden observar en la **Tabla 6**: constante de disociación de un ácido (expresada en su forma logarítmica como pK_a), los coeficiente de reparto octanol-agua (como $\log K_{ow}$), de partición del carbono orgánico (como $\log K_{oc}$) y de adsorción (como $\log K_d$) [48,101]. De estos valores se pueden obtener numerosas conclusiones. El valor del coeficiente de adsorción está relacionado con el relativo a la partición del carbono orgánico: mientras que el primero representa la distribución de una sustancia entre el agua y el suelo en cuestión (a valores más altos, mayor adsorción), el segundo es una estimación normalizada de la capacidad de un compuesto para ser retenido por la materia orgánica de dicho suelo [102]. En este caso, dichos coeficientes para el diclofenaco y el resto de NSAIDs son medios para la partición del carbono orgánico y relativamente bajos para la adsorción, por lo que estos contaminantes no se adsorberían en los lodos de aguas residuales, quedando mayoritariamente en la fracción líquida [101]. Para el diclofenaco en particular, considerando el valor de pK_a el pH del ambiente sería un factor determinante en el proceso, pues la pérdida del protón ácido cambiaría la polaridad de la sustancia y su comportamiento

en disolución. Por su parte, el valor del coeficiente de reparto octanol-agua da cuenta en la práctica de la afinidad de un compuesto por los tejidos grasos de un organismo. En el diclofenaco dicha afinidad es alta, lo que presupone una posible bioacumulación en biota [103].

Tabla 6. *Propiedades físicas de algunos NSAIDs reportadas en la literatura.*

Propiedad	diclofenaco	ibuprofeno	naproxeno
pK_a	4.15	4.5-5.2	4.2
Log K_{ow}	4.5	4.0	3.2
Log K_{oc}	2.20-3.42	1.82-3.12	2.00-3.00
Log K_d	1.26-2.18	1.00-1.78	1.03-1.71

La **Tabla 7** muestra algunos de los métodos analíticos desarrollados en los últimos diez años para la determinación de diclofenaco en distintas matrices medioambientales (agua, biota, suelos y sedimentos) [82,104-113]. Las técnicas cromatográficas han sido las más empleadas y en cuanto a técnicas de extracción, se han empleado los ultrasonidos, las microondas y los líquidos presurizados, así como materiales adsorbentes (e.g. extracción adsorbtiva con barra de agitación, SBSE). La mayoría de los métodos requiere una etapa de limpieza de muestra (clean-up); algunos, una derivatización previa a la separación cromatográfica. En la presente Tesis, se ha desarrollado un método basado en la IT-SPME-nano-LC-DAD, el cual se ha aplicado para analizar diclofenaco (como analito diana y ejemplo entre los ECs) en muestras de agua y farmacéuticas. Comparado al resto de metodologías, en el método en cuestión, en donde se emplean novedosas fases adsorbentes tales como nanomateriales y polímeros, se minimiza al máximo el pretratamiento de muestras, consiguiendo bajos LOD y LOQ, así como recuperaciones cuantitativas (100 ± 10%). El uso de un sistema nanocromatográfico además de disminuir el empleo de disolventes y reactivos, permite minimizar la dilución de los analitos en el sistema y por lo tanto aumentar la sensibilidad del método.

Tabla 7. Métodos analíticos para la determinación de diclofenaco en los últimos 10 años

Matriz	Pretratamiento de muestra (extracción/clean-up/derivatización)	Técnica	LOD	LOQ	Rec. (%)	Ref.
Aguas	-/SPE/-	UPLC-HRMS	5.0 ng/L	15.4 ng/L	105.1	[104]
	MSPE/-/-	Cap-LC-MS	50 ng/L	166.7 ng/L	83-93	[82]
Biota	MSPE-UAE/-/-	HPLC-DAD	0.7 ng/L	2.4 µg/L	77.7	[105]
	Dilución/SPE/-	UPLC-TOF-MS	-	-	-	[106]
Sedimentos	Dilución/SPE/-	LC-TOF-MS	-	-	-	[107] ^a
	Centrifugación y dilución/SPE/-	LC-MS/MS	-	0.86-20.0 ng/mL	92-105	[108] ^b
	UAE/SPE/-	UPLC-MS/MS	0.034 ng/g	0.068 ng/g	87.1-103	[109]
	UAE/SPE/-	HP LC-DAD/FLD	-	3.63 µg/kg	72.9	[110]
	MAE/SPE/BSTFA-TMCS	GC-MS	2.0 ng/kg	6.5 ng/kg	101	[111]
Suelos	UAE/SPE/MTBSTFA	GC-MSD	-	1.2 ng/g	114	[112]
	UAE/SPE/-	HP LC-DAD/FLD	-	5.31 µg/kg	92.4	[110]
Aguas	PLE/SPE/-	LC-ESI-MS/MS	2.1 ng/g	7.1 ng/g	96	[113] ^c
	MAE/SPE/BSTFA-TMCS	GC-MS	2.0 ng/kg	6.5 ng/kg	93	[111]
	-/-/-	IT-SPME-nano-LC-DAD	1 ng/mL	3.3 ng/mL	100	Tesis

^aanálisis de diclofenaco y metabolitos, ^banálisis de diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno, ^caplicable a sedimentos

LOD límite de detección, LOQ límite de cuantificación, Rec. Recuperación, Ref. Referencia, SPE extracción en fase sólida, UPLC cromatografía líquida de ultra-alta resolución, HRMS espectrometría de masas de alta resolución, MSPE extracción en fase sólida magnética, Cap-LC cromatografía líquida capilar, SBSE extracción adsorbtiva con barra de agitación, UAE extracción asistida por ultrasónicos, HPLC cromatografía líquida de alta resolución, DAD detector de flúor, LC cromatografía líquida, TOF tiempo de vuelo, MS espectrometría de masas, MS/MS espectrometría de masas en tándem, FLD detector de fluorescencia, MAE extracción asistida con microondas, BSTFA N,O-bis(trimetilil)trifluoroacetamida, TMCS trimetilclorosilano, MTBSTFA N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida, MSD detección selectiva de masas, PLE extracción con líquidos presurizados, ESI ionización por electrospray, IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo, nano-LC nanocromatografía líquida

1.5.2 Pesticidas

El término “pesticida” engloba a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada para prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas sean insectos, plantas, hongos, roedores o bacterias [114]. Por lo tanto, los pesticidas se pueden clasificar dependiendo del blanco de aplicación en insecticidas, herbicidas, fungicidas y rodenticidas respectivamente. En la **Tabla 8** se muestran los diferentes tipos de pesticidas y su respectivo modo de acción (nota: los biocidas, pesticidas de uso no agrícola, se pueden clasificar como PPCPs y no se incluyen en la tabla). Muchos pesticidas atacan el sistema nervioso (SN) de sus blancos y considerando similitudes de los procesos neuroquímicos, este hecho presupone un riesgo para los seres humanos [115].

En los últimos 40 años, el uso de pesticidas ha aumentado considerablemente [115]. Por ejemplo, las estadísticas revelan que en la UE durante el periodo 1992-2003 y para aumentar el rendimiento de los cultivos, se utilizaron más de 140.000 toneladas de pesticidas [116]. En la actualidad, estos compuestos están contaminando la comida, el agua, el suelo y el medio ambiente. Estudios poblacionales en los EEUU mostraron que la mayoría de las personas presentaba concentraciones detectables de metabolitos de pesticidas en la orina [117]. No obstante, no sólo los pesticidas representan una amenaza, sino también sus productos de degradación que pueden llegar a ser más tóxicos que las sustancias de partida [17].

El empleo negligente de pesticidas puede producir daño en los propios cultivos y no controlar las plagas lo que pone en riesgo tanto a la salud humana como al resto del medio ambiente. Estos compuestos, en especial los más apolares, han sido objeto de estudio durante décadas [17]. Su bioacumulación ha engendrado problemas en el medio ambiente, sobre todo en aves [115]. En estricto rigor, no deberían ser considerados ECs. Sin embargo, muchos de ellos no están legislados y por otra parte, en relación a sus metabolitos (e.g. para la TBA, la desetil-TBA) existe una falta de datos toxicológicos [118]. Es más, los pesticidas modernos son termolábiles, más polares, menos volátiles y persistentes [119]. Tan sólo un número muy reducido de estos últimos y los metabolitos mencionados han sido incluidos en las listas de contaminantes candidatos para ser prioritarios [96].

Después de ser aplicados en determinado campo, los pesticidas pueden ser degradados por vía biótica (i.e. microbiológica) o abiótica (i.e. fotólisis e hidrólisis). Posteriormente, estas sustancias llegan a aguas subterráneas por lixiviación y a aguas superficiales por escorrentías y/o procesos de irrigación [119]. Tal es la preocupación generada por los pesticidas, que desde 1975, la normativa europea ha fijado la concentración total de pesticidas en aguas superficiales destinadas a extracción de agua potable entre 1 y 5 µg/L [120]. Posteriormente, se establecieron límites de 100 ng/L para un pesticida individual y de 500 ng/L en total en aguas de consumo humano [121].

Tabla 8. Clasificación de pesticidas y su modo de acción sobre el blanco de aplicación. Datos obtenidos de [115,117]. Los asteriscos indican a los pesticidas incluidos en la lista de contaminantes prioritarios en la Directiva 2013/39/UE.

Tipo	Familia	Ejemplo	Modo de Acción
Insecticida	Benzoilfenilurea	Novalurón	Inhíbe síntesis de quitina
	Carbamatos	Metomil	Efecto neurotóxico
	Organoclorados	Endosulfán*	Altera movimiento iónico (SN)
	Organofosforados	Clorpirifos*	Inhibición de la acetilcolinesterasa
	Piretroides	Cipermetrina*	Afecta los canales de sodio (SN)
Herbicida	Amidas	Diflufenican	Inhíbe la biosíntesis de carotenoides
	Cloroacetanilidas	Metazacloro	Inhíbe la división celular
	Dinitroanilinas	Trifluralin	Inhíbe la división celular
	Dinitrofenoles	Dinoterbo	Perturba la fotosíntesis
	Imidazolinonas	Imazetapir	Altera la biosíntesis de aminoácidos
	Nitrilos	Bromoxinil	Inhíbe la fotosíntesis
	Sulfonilureas	Rimsulfuron	Altera la biosíntesis de aminoácidos
	Triazinas	Atrazina*	Inhíbe la fotosíntesis
	Ureas	Diurón*	Inhíbe la fotosíntesis
Fungicida	Amidas	Metalaxil	Afecta síntesis RNA
	Antibióticos	Validamicina	Inhibición de la trehalasa
	Benzimidazoles	Carbendazima	Inhíbe síntesis tubulina
	Dinitroanilinas	Fluazinam	Perturba producción de energía
	Carbamatos	Mancozeb	Altera la respiración celular
	Estrobilurina	Azoxystrobin	Inhíbe la respiración celular
	Ftalimida	Captan	Inhíbe la respiración celular
	Imidazoles	Procloraz	Perturba funciones de membrana
	Organoclorados	Triclorofenol	Altera la respiración celular
	Triazoles	Tebuconazol	Altera biosíntesis del esteroil
Rodenticida	Alcaloides	Estricnina	Alteración del SN
	Anticoagulantes	Warfarin	Inhibición síntesis vitamina K (SN)
	Organofluorado	FAS ¹	Inhíbe la respiración celular

¹fluoroacetato de sodio

En la presente Tesis se han estudiado dos familias de compuestos: por una parte, los compuestos organofosforados (OPs) empleados como insecticidas (e.g. clorfeninfos y clorpirifos); por otra, las triazinas utilizadas como herbicidas (e.g. atrazina, simazina y TBA). La TBA no es todavía en la actualidad un contaminante prioritario, siendo autorizado su uso como herbicida en la UE por el reglamento de ejecución 820/2011, después de haber sido prohibida en primera instancia [122].

1.5.2.1 OPs

Estos compuestos son utilizados como insecticidas, i.e. para matar insectos inhibiendo ciertas enzimas vitales de los mismos. En este trabajo se han estudiado dos OPs: clorfenvinfos y clorpirifos (en la **Figura 10** se muestran las estructuras químicas para ambos).

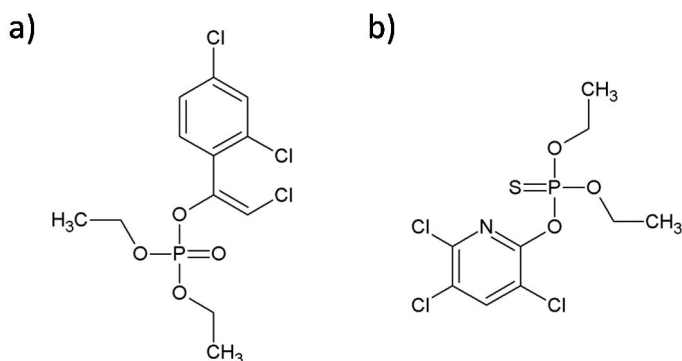


Figura 10. Estructuras químicas de OPs. a) clorfenvinfos. b) clorpirifos.

Históricamente, el uso y desarrollo de estos compuestos data de la Segunda Guerra Mundial. Aunque utilizados al principio como armas químicas, pronto se descubrió que estas sustancias eran efectivas para eliminar insectos perjudiciales mediante bloqueo de enzimas del SN tales como las colinesterasas (e.g. acetilcolinesterasa). Uniéndose a la acetilcolinesterasa, los OPs inhiben la descomposición de acetilcolina (un neurotransmisor), produciéndose una acumulación de esta última afectando el SN central de los insectos (así como también ocurre en mamíferos).

Clorfenvinfos y clorpirifos han sido dos insecticidas de uso extendido incluidos recientemente en la lista de contaminantes prioritarios de la Directiva Europea 2008/105/CE debido a su naturaleza peligrosa [13]. Por ejemplo en aguas, las CMA para clorfenvinfos y clorpirifos son 300 y 100 ng/L respectivamente. Por ejemplo, en cuanto a límites permitidos en productos agrícolas se refiere, la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) ha establecido que los rangos de cantidad tolerada de clorfenvinfos y de clorpirifos son de 0.005-0.2 mg/kg y 0.05-15 mg/kg respectivamente [123].

El uso de ambas sustancias está restringido: por una parte, se permite el uso del clorpirifos como pesticida hasta el 31 de enero del 2018; por otra, el clorfenvinfos está prohibido desde junio del 2007.

La **Tabla 9** muestra las propiedades fisico-químicas de clorfenvinfos y clorpirifos (medidas a 25°C). El valor del coeficiente de reparto octanol-agua para ambos presupone posible bioacumulación en los tejidos, representando una amenaza para la vida. Son compuestos bastante volátiles ($P_v > 1 \cdot 10^{-6}$ mmHg), pudiendo viajar a grandes distancias y contaminar las distintas matrices medioambientales.

Tabla 9. Propiedades fisico-químicas de los OPs analizados. Los valores no reportados en la bibliografía se designan por “nr”.

Propiedad	Clorfenvinfos	Clorpirifos
Mm (g/mol)	359.6	350.6
ρ (g/cm ³)	1.36	1.44
Solubilidad (mg/L)	nr	1.4
Log K _{ow}	3.81	4.96
P _f (°C)	-19	42
P _{eb} (°C)	167-170	160
P _v (mmHg)	$7.5 \cdot 10^{-6}$	$2.0 \cdot 10^{-5}$

Mm masa molecular ρ densidad P_f punto de fusión P_{eb} punto de ebullición P_v presión de vapor

1.5.2.2 Triazinas

Estos compuestos se han utilizado como herbicidas desde hace bastante tiempo. El término “herbicida” hace referencia a sustancias (o mezcla de ellas) que inhiben el crecimiento o eliminan plantas indeseadas. Las triazinas estudiadas en el presente trabajo son la simazina, la atrazina y la TBA (en la **Figura 11**, se pueden ver las respectivas estructuras químicas).

Las triazinas son algunos de los herbicidas más antiguos. La investigación sobre estas sustancias se remonta a 1950. De uso agrícola y urbano cotidiano, se utilizan sobre suelos, líneas férreas, carreteras e incluso campos de golf. También, son ideales para programas de control selectivo de malas hierbas ya que existen plantas resistentes que son capaces de metabolizarlas, mientras que las que no lo son, se eliminan. Su modo de acción, como se ha visto con anterioridad, es inhibir la fotosíntesis de las plantas. Los compuestos triazínicos, mayoritariamente los de uso agrícola, llegan al entorno marino afectando a la flora acuática

y en consecuencia al resto de la cadena trófica. Tienen tendencia a la lixiviación, por lo que pueden llegar a aguas subterráneas.

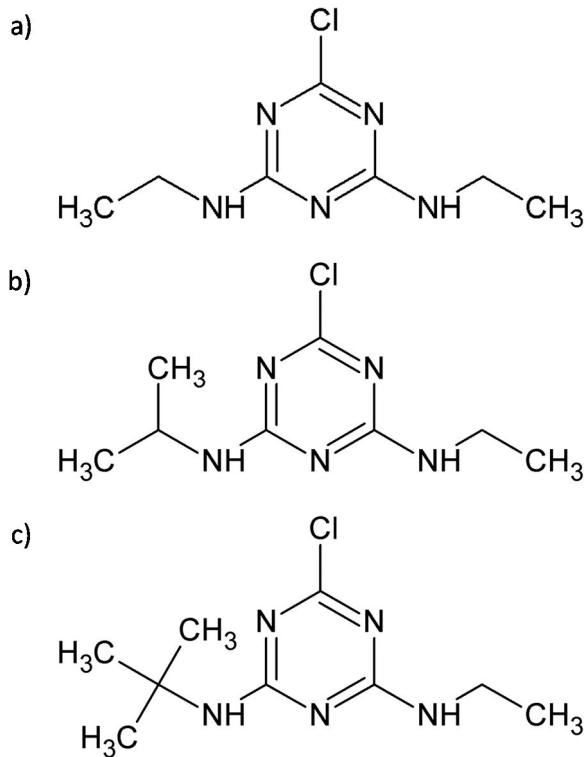


Figura 11. Estructuras químicas de las triazinas. a) simazina. b) atrazina. c) TBA.

Estas sustancias, como otros pesticidas, se consideran contaminantes químicos importantes ya que se caracterizan por ser persistentes en términos relativos (i.e. aumentan su persistencia bajo ciertas condiciones) [6]. No obstante, al ser ampliamente utilizados, la exposición a ellos es constante de todas formas. En aguas, su degradación es lenta. Por ello, la simazina y la atrazina han sido incluidas en la lista de contaminantes prioritarios de la Directiva Europea 2008/105/CE debido a su persistencia y naturaleza peligrosa [13]. En el caso de la simazina, su uso está prohibido en la UE. La TBA (que no es un contaminante prioritario en la actualidad) ha sido permitida. Por su parte, la USEPA ha incluido a la simazina y la atrazina en el grupo de EDCs [124].

Las algas son bioindicadores de las triazinas y por lo tanto, se ha legislado en torno a los valores contenidos en este tipo de plantas. Gracias a ello, se han podido establecer límites máximos permitidos en alimentos y piensos de origen vegetal y animal para simazina y TBA de 0.01 y 0.05 mg/kg respectivamente. En cuanto a la atrazina, no se ha definido un límite en algas; sin embargo, sólo se permite un máximo de 0.05 mg/kg en hortalizas y legumbres [125].

Las propiedades fisico-químicas de las triazinas se pueden observar en la **Tabla 10**. Presentan una menor (aunque no despreciable) tendencia a la bioacumulación (valores de $\log K_{ow}$) comparado a los OPs (**Tabla 9**), siendo también menos volátiles que estos últimos (valores de P_v). Por otra parte, las triazinas son más solubles y esto sumado a su persistencia y lenta degradación en agua, las convierte en un riesgo para numerosos organismos.

Tabla 10. Propiedades fisico-químicas de las triazinas analizadas.

Propiedad	Simazina	Atrazina	TBA
Mm (g/mol)	201.7	215.7	229.7
ρ (g/cm³)	1.33	1.19	1.12
Solubilidad (mg/L)	6.2	34.7	9
Log K_{ow}	2.18	2.61	3.03
P_f (°C)	225-227	173	175-176
P_{eb} (°C)	366	295	373
P_v (mmHg)	$6.1 \cdot 10^{-9}$	$2.89 \cdot 10^{-7}$	$6.75 \cdot 10^{-7}$

Mm masa molecular ρ densidad P_f punto de fusión P_{eb} punto de ebullición P_v presión de vapor

En consecuencia a lo expuesto, existe interés en desarrollar métodos analíticos que permitan determinar estos contaminantes en matrices complejas (e.g. algas) o en aquellas donde se necesite una elevada sensibilidad (e.g. aguas).

1.5.2.3 Métodos analíticos para determinar OPs y triazinas

En la **Tablas 11 y 12** se pueden ver algunos de los métodos analíticos desarrollados en los últimos diez años para la determinación de OPs [126-135] y triazinas [128,134-138] respectivamente en distintas matrices medioambientales.

En el caso de los OPs, las metodologías desarrolladas (ver **Tabla 11**) involucran procedimientos de pretratamiento de muestras de varios pasos (e.g. HS-SPME, QuEChERS, DLLME u otro), método de separación cromatográfico (GC o LC) y como detección, por lo general, espectrometría de masas.

Tabla 11. Métodos analíticos para la determinación de OPs en los últimos 10 años

Análito	Matriz	Pretratamiento de muestra (extracción/clean-up)	Técnica	LOD	LOQ	Rec. (%)	Ref.
Clorp	suelos	HS-SPME/ -	GC-TSD	0.034 ng/g	-	98.9-102.9	[126]
Clorp	suelos	HS-SPME/ -	GC- μ ECD	0.033 ng/g	0.11 ng/g	75	[127]
Clorf	aguas	SPE (evaporación/reconstitución)/ -	GC-MS/MS	26.5 ng/L	88.4 ng/L	98.2-102	[128]
Clorp				17.8 ng/L	59.2 ng/L	66.4-84.5	
Clorp	biota	QuEChERS/SPE	GC-FPD	0.007 mg/kg	0.02 mg/kg	97.8-107	[129]
Clorp	aguas	NHS-DLLME/ -	GC-MS	4.7 ng/L	15.7 ng/L	66.4-91	[130]
Clorp	aguas	DLLME/ -	GC-MS	2.5 ng/L	8.2 ng/L	93.7-129.4	[131]
Clorp	aguas	DLLME/ -	GC-FPD	5 pg/mL	-	85.2-105.8	[132]
Clorf	aguas	SPE (evaporación)/ -	GC-MSD	21 ng/L	-	85	[133]
Clorp	aguas	SPE (evaporación/reconstitución)/ -	LC-ESI-MS/MS	8.6 ng/mL	26 ng/mL	37-51	[134]
Clorp	sedimentos	MSPD (evaporación/reconstitución)/ -	LC-ESI-MS/MS	6.5 ng/g	20 ng/g	48-52	
Clorp	biota	QuEChERS/filtración	LC-ESI-MS/MS	3.5 ng/g	11 ng/g	73-101	
Clorf	aguas	SPE (evaporación)/ -	GC-MS (SIS)	9.6 ng/L	31.7 ng/L	90-99.3	[135]
Clorp				48 ng/L	158.4 ng/L	86-96.3	
Clorf	Aguas	MSPE/ -	IT-SPME-Cap-LC-DAD	100 ng/L	-	95	Tesis
Clorp				50 ng/L	-	100	
Clorf		- / -	Magnetic-IT -SPME-Cap-LC-DAD	50 ng/L	167 ng/L	94	
Clorp				10 ng/L	33 ng/L	97	

Clorf clorfeninfos, Clorp clorpirifos LOD límite de detección, LOQ límite de cuantificación, Rec. Recuperación, Ref. Referencia, HS-SPME microextracción en fase sólida en espacio de cabeza, GC cromatografía de gases, TSD detector termiónico específico, μ ECD detector de microcaptaura electrónica, SPE extracción en fase sólida, MS/MS espectrometría de masas en tándem, QuEChERS “quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe” (rápido, fácil, barato, eficiente, robusto y seguro) método de extracción, FPD detector fotométrico de llama, NHS uso de disolventes no halogenados, DLLME microextracción líquido-líquido dispersiva, MS espectrometría de masas, MSD detección selectiva de masas, LC cromatografía líquida, ESI ionización por electrospray, MSPD dispersión de la matriz en fase sólida, MS (SIS) “selected ion storage” trampa iónica, MSPE extracción en fase sólida magnética, IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo, Cap-LC cromatografía líquida capilar, DAD detector de fila de diodos, Magnetic-IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo magnética

Tabla 12. Métodos analíticos para la determinación de triazinas en los últimos 10 años

Análito	Matriz	Pretratamiento de muestra (extracción/clean-up)	Técnica	LOD	LOQ	Rec. (%)	Ref.
Atra	aguas	SPE (evaporación/reconstitución)/ -	GC-MS/MS	29.2 ng/L	97.2 ng/L	97-105	[128]
Sima				14.9 ng/L	49.6 ng/L	95-103	
TBA				7.9 ng/L	26.4 ng/L	85.9-99	
Atra	aguas	SPE (evaporación/reconstitución)/ -	LC-ESI-MS/MS	1.64 ng/mL	4.98 ng/mL	109-127	[134]
Atra	sedimentos	MSPD (evaporación/reconstitución)/ -	LC-ESI-MS/MS	0.45 ng/g	1.37 ng/g	78-85	
Atra	biota	QuEChERS/filtración	LC-ESI-MS/MS	0.22 ng/g	0.67 ng/g	73-94	
Sima	aguas	SPE (evaporación)/ -	GC-MS (SIS)	19.2 ng/L	63 ng/L	104.9-111.3	[135]
TBA				41 ng/L	135.3 ng/L	76.7-94.9	
Atra	aguas	DMSPE/ -	UPLC-HRMS	6 ng/L	12 ng/L	89.4-94.7	[136]
Sima				3 ng/L	10 ng/L	88.7-93.2	
TBA				3 ng/L	6 ng/L	72.6-88.6	
Atra	biota	MSPD (evaporación/reconstitución)/ -	HPLC-DAD	0.043 mg/kg	0.12 mg/kg	82-96	[137]
Sima				0.050 mg/kg	0.13 mg/kg	97-99	
TBA				0.046 mg/kg	0.12 mg/kg	86-95	
Atra	sedimentos	PLE/SPE (evaporación/reconstitución)	HPLC-ESI-MS/MS	0.0015 µg/kg	-	30-50	[138]
Sima				0.03 µg/kg	-		
TBA				0.0015 µg/kg	-		
Atra	biota	UAE/SPE (evaporación/reconstitución)	HPLC-ESI-MS/MS	0.042 µg/kg	-	30-50	
Sima				0.21 µg/kg	-		
TBA				0.012 µg/kg	-		
Atra	Aguas	- / -	Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD	0.3 µg/L	-	99-110	Tesis
Sima				0.4 µg/L	-		
TBA				0.3 µg/L	-		

Atra atrazina, Sima simazina, TBA terbutilazina, LOD límite de detección, LOQ límite de cuantificación, Rec. Recuperación, Ref. Referencia, SPE extracción en fase sólida, GC cromatografía de gases, MS/MS espectrometría de masas en tandem, LC cromatografía líquida, ESI ionización por electrospray, MSPD dispersión de la matriz en fase sólida, QuEChERS "quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe" (rápido, fácil, barato, eficiente, robusto y seguro) método de extracción, MS (SIS) "selected ion storage" trampa iónica, DMSPE extracción en fase sólida micro dispersiva, UPLC cromatografía líquida de ultra-alta resolución, HRMS espectrometría de masas de alta resolución, HPLC cromatografía líquida de alta resolución, DAD detector de fila de diodos, PLE extracción con líquidos presurizados, UAE extracción asistida por ultrasonidos, Magnetic-IT-SPME microextracción en fase sólida magnética, Cap-LC cromatografía líquida capilar

En esta Tesis, tanto para el análisis de OPs como para el de triazinas, se ha buscado disminuir la manipulación, el tiempo y los pasos del proceso analítico. Para ello, se ha desarrollado un método basado en la IT-SPME magnética (Magnetic-IT-SPME) acoplada Cap-LC-DAD [71], en donde las etapas de extracción, preconcentración, separación y detección están acopladas. Para la determinación de pesticidas, se empleó el nanomaterial desarrollado por MINTOTA y RTMM [81], al igual que en el análisis del diclofenaco (en este caso, se ensayaron además otros adsorbentes basados en nanomateriales y polímeros). A diferencia del método IT-SPME-nano-LC-DAD desarrollado para el diclofenaco, en el método para la determinación de pesticidas se aprovechan también las propiedades magnéticas de las NPs de Fe_3O_4 para aumentar la eficiencia de extracción mediante la aplicación de un campo magnético externo. Es más, para OPs, se trabajó adicionalmente con una variante fuera de línea (MSPE-IT-SPME-Cap-LC) del método, en la cual las recuperaciones obtenidas (calculadas de manera diferente en estudios de remediación de aguas que se explicarán posteriormente) dan prueba de la eficacia del adsorbente magnético.

Teniendo en cuenta la automatización y escasa manipulación, la metodología puesta a punto en este trabajo representa un avance significativo en el análisis traza de contaminantes en aguas. Para OPs (particularmente, clorpirifos) los parámetros analíticos son comparables a aquellos obtenidos por técnicas más complejas y costosas (ver **Tabla 11**).

1.5.3 Nanomateriales

En la actualidad, los nanomateriales ocupan un sitio importante en el panorama científico, respaldado por el incremento sostenido en el número de citas sobre nanomateriales en el medio ambiente en los diez últimos años (**Figura 12**). El término “nanomaterial” engloba estructuras químicas de variada geometría (partículas, poros, prismas o tubos) con un tamaño menor a los 100 nm en una o más dimensiones, las cuales presentan propiedades únicas tales como una elevada relación superficie-volumen, características térmicas favorables y posibilidad de funcionalización superficial combinado con una alta capacidad para adsorber sustancias, entre otras [139]. Por lo tanto, dichos nanomateriales poseen numerosas aplicaciones en diversas áreas, por ejemplo, la ciencia, la medicina y la industria. Como consecuencia, existen más de 1600 productos basados en ellos (cifra que aumentará con el correr del tiempo) que se encuentran disponibles en el mercado [140]. Tanto la presencia medioambiental como la exposición de humanos y otros organismos a estos compuestos crecerán, lo que supone un problema ya que el conocimiento en torno a ellos, así como la normativa reguladora al respecto, no son suficientes lo que los convierte en una de las familias más recientes de ECs [6].

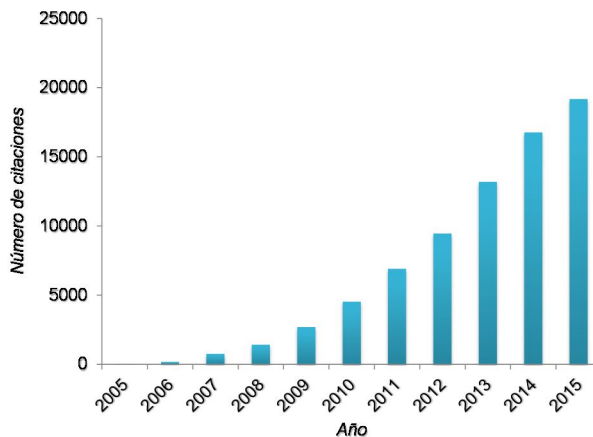


Figura 12. Evolución en el número de citas sobre nanomateriales en el medio ambiente desde el año 2005. Fuente Web of Science (Enero 2016).

Los nanomateriales previamente mencionados, sintetizados con fines comerciales o científicos, corresponden a los denominados nanomateriales manufacturados (MNs). Es necesaria hacer esta distinción ya que existen nanomateriales que se forman naturalmente

(compuestos de sílice amorfa, negro de carbón y materia particulada ultrafina) por desgaste/erosión y erupciones y otros que se originan involuntariamente (principalmente materia particulada ultrafina) en procesos industriales, de laboratorio y combustión [141]. Aunque en términos rigurosos todos pertenecen a la familia de los nanomateriales, la investigación actual está enfocada principalmente a los MNs.

Los MNs se clasifican en los siguientes tipos [141]:

- Metálicos: NPs generalmente esféricas compuestas entera o parcialmente de uno o varios metales y/u óxidos metálicos, con propiedades ópticas, térmicas, magnéticas y redox únicas.
- Quantum Dots: son nanocristales semiconductores a base de complejos metálicos, de selenio o de azufre con propiedades ópticas y eléctricas especiales.
- Basados en el carbono: compuestos principalmente de carbono, poseen formas esféricas, elipsoidales o tubulares cuyas propiedades fundamentales son su elevada resistencia, elasticidad y conductibilidad eléctrica (e.g. los CNTs).
- Dendrímeros: polímeros nanométricos ramificados repetitivamente que poseen funcionalidad única en sus terminaciones y a su vez, cavidades para la interacción con otras moléculas.
- Composites o Híbridos: combinan ciertas NPs con otras o con materiales de mayor dimensión.

En el presente, se sostiene que la clave para comprender la toxicidad de los nanomateriales se relaciona con su pequeño tamaño (más pequeño que el de las células y sus orgánulos), el cual les permite penetrar las estructuras biológicas y alterar sus funciones [142]. Pueden eventualmente ser absorbidos por vía dérmica, inhalados o ingeridos [141]. Algunos de los efectos adversos relacionados con estar expuestos a nanomateriales (e.g. NPs) son: citotoxicidad y genotoxicidad (relativa al ácido desoxirribonucleico, DNA) [140], producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [143], enfermedades cardiovasculares [142], entre otros.

Es tanto el interés generado por los nanomateriales que en la UE mediante el Reglamento 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor [144] se definió el concepto de “nanomaterial artificial”, obligando a etiquetar todos los ingredientes presentes en forma de nanomateriales artificiales, cuyos nombres deben ser acompañados de la palabra “nano” entre paréntesis. Por su parte, la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económicos (OECD) se ha centrado en 13 MNs (incluidas las nanopartículas de plata y las de oro, AgNPs y AuNPs respectivamente) de importancia comercial para estudios de seguridad, riesgos y toxicología [140].

El presente trabajo se centra en el desarrollo de metodologías novedosas para caracterizar y monitorizar AgNPs (esféricas) en aguas, suelos y sedimentos. Se utilizaron AuNPs como patrones de referencia. Sin embargo, en aguas, el análisis puede extenderse a AuNPs, así como también a AgNPs no esféricas.

1.5.3.1 AgNPs

Antes de discutir la toxicidad de las AgNPs, es pertinente comentar los aspectos que les han permitido convertirse en uno de los nanomateriales más utilizados e investigados a día de hoy. Al igual que éstos, el número de citaciones sobre AgNPs ha crecido sostenidamente (y en este caso, de manera abrupta) en los diez últimos años (ver **Figura 13**).

En el presente, las AgNPs son los nanomateriales más ampliamente comercializados (cientos de toneladas por año) [145]. A causa de sus propiedades antibacterianas, se utilizan en productos de consumo habitual tales como detergentes, ropa, telas, aditivos de comida y aparatos para medicina, entre otros (e.g. detergentes especiales, quitamanchas, calcetines para diabéticos, polvos y aerosoles antibacterianos, recubrimientos antimicrobianos, cepillos de dientes, etc.) [146-152]. En el caso de la diabetes, se producen complicaciones a nivel arterial en los pies (lo que se conoce como el “pie diabético”) y esto lleva a una mayor sensibilidad a golpes e infecciones que pueden generar úlceras y gangrena. Las AgNPs brindan un ambiente antiséptico que permite prevenir lo antes mencionado.

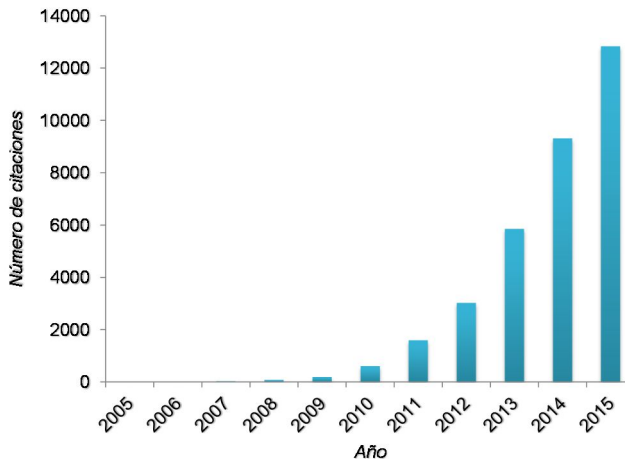


Figura 13. Evolución en el número de citaciones sobre AgNPs desde el año 2005. Fuente Web of Science (Enero 2016).

No sólo para la fabricación de productos estas partículas pueden ser empleadas. Por ejemplo, en el campo de la ciencia, trabajos recientes han demostrado que las AgNPs son efectivas como adsorbentes de una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos en muestras biológicas tales como proteínas, péptidos y Pb. Por otra parte, la preconcentración de analitos aromáticos en AgNPs se utilizó exitosamente para mejorar las recuperaciones en el análisis de biofluidos. Además, se emplean para funcionalizar matrices poliméricas y así proveer bioresistividad en la síntesis de nanomateriales adsorbentes. Otro uso incluye su incorporación como parte del recubrimiento de fibras o del relleno de capilares en técnicas de SPME. Por último, se han utilizado ampliamente en la fabricación de distintos tipos de sensores (especialmente, biosensores) [153-156] así como en óptica-electrónica [157] y catálisis [158].

Entre las propiedades que hacen de las AgNPs nanomateriales atractivos para todo tipo de aplicaciones [153,154] se encuentran:

- Pequeño tamaño y elevada área superficial.
- Superficies funcionalizables (i.e. uso de diversos agentes de capping o ligandos superficiales)
- Elevado coeficiente de extinción.
- Alta sensibilidad a cambios físico-químicos de su entorno
- Excelente conductividad eléctrica
- Estabilidad en medios acuosos
- Biocompatibilidad (i.e. no interfiere ni degrada el entorno biológico que las rodean)

Así como se ha discutido para los nanomateriales en general, el tamaño es una característica fundamental de las AgNPs [156]. A manera ilustrativa, se ha demostrado que la actividad antibacteriana depende del tamaño de las partículas [159], así como también de su forma [160]. Es más, el tamaño de las partículas (y el agente capping) se relaciona con la capacidad de liberar cationes plata (Ag^+) en condiciones aeróbicas [161,162] y matrices acuosas (e.g. aguas naturales) [163].

Es sabido desde tiempos antiguos que la Ag^+ posee actividad antimicrobiana [160]. Por ello, ha existido un debate sobre la especie causante específicamente de este comportamiento (las AgNPs o la Ag^+ que ellas pueden liberar) [164]. Independiente de lo que se piense, lo cierto es que las AgNPs poseen características concretas como el tamaño que les permiten penetrar tejidos biológicos, lo que sumado a ser fuente de cationes plata,

las convierte en un riesgo potencial para los organismos. La toxicidad de las AgNPs está relacionada con estos aspectos. Estudios han demostrado que las AgNPs per se son tóxicas para organismos acuáticos con valores bajos de concentraciones críticas toleradas (0.19 nM) [165]. Aunque la toxicidad de la plata es relativamente baja en humanos [166], no lo es para otros organismos menores [167] y si la cadena trófica se ve alterada, todas las especies estarían en riesgo [168]. En consecuencia, las AgNPs constituyen ECs importantes y es de suma necesidad desarrollar los distintos estudios científicos asociados (ver **Figura 2**).

Considerando que muchos productos de la vida cotidiana utilizan AgNPs, los organismos y el medio ambiente están expuestos (sin tomar en cuenta los desechos de AgNPs de actividades industriales y de laboratorio que pueden contaminar las diferentes matrices ambientales). El caso de la contaminación de suelos es interesante: las AgNPs pueden llegar a este compartimento por vía directa (uso de pesticidas o fertilizantes orgánicos [169,170]) o vía indirecta (deposición desde el aire o infiltración desde aguas subterráneas [171]). Una vez en el suelo, estas partículas pueden ser retenidas en menor o mayor medida dependiendo de las propiedades del mismo [172].

Una característica propia de las AgNPs es la denominada banda de resonancia de plasmones de superficie (SPRB) [173]. A escala nanométrica, el proceso de reflexión y conducción del metal es diferente. Los electrones libres (electrones d para AgNPs y AuNPs) se mueven a través de la superficie metálica. Sin embargo, en presencia de una radiación electromagnética que posee un tamaño mayor al de la NP (como la luz), dichos electrones entran en condiciones de resonancia [174].

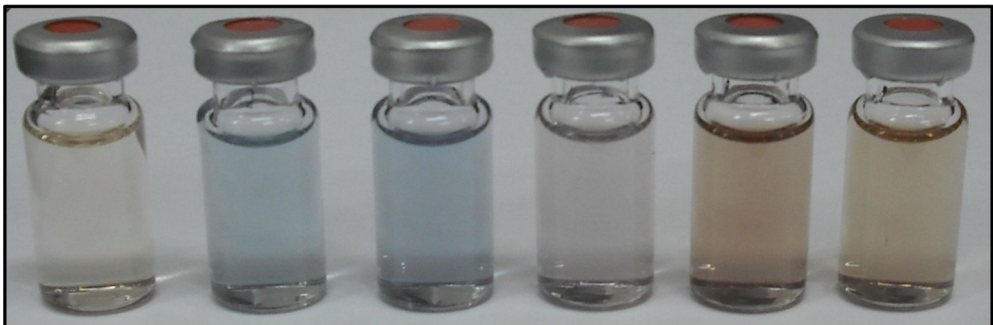


Figura 14. Síntesis de AgNPs con diferentes tamaños y formas que poseen un perfil particular de banda de resonancia de plasmones de superficie (SPRB).

Esto ocurre en los electrones libres confinados en la superficie, con lo que se polariza la NP. Los electrones (que a diferencia del metal, tienen una libertad de movimiento limitada al tamaño de la partícula) oscilan con la frecuencia de la onda electromagnética incidente. Se generan movimientos de cargas eléctricas que conlleva a una dispersión de la onda incidente (i.e. scattering). Por lo tanto en una NP, aparte de luz absorbida, existe luz dispersada. La suma de ambos fenómenos se traduce en la aparición de una banda característica (de un color determinado) para cada NP metálica cuya posición depende del tamaño, la forma y del estado de agregación, entre otras características [175, 176, 177]. La **Figura 14** muestra algunas síntesis de AgNPs que varían en tamaño, forma y estado de agregación, las cuales presentan perfiles de SPRB distintos, por lo tanto, colores diferentes.

1.5.3.2 AuNPs

Aunque la presente Tesis está centrada en el análisis de la AgNPs, las AuNPs también han sido estudiadas para así extender las metodologías desarrolladas a otras partículas metálicas y a su vez, contrastar los comportamientos observados con el de otros analitos.

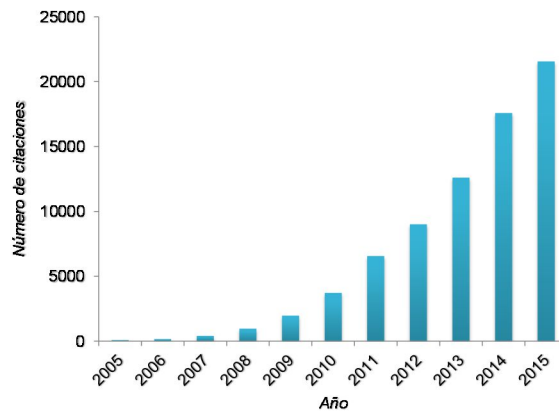


Figura 15. Evolución en el número de citaciones sobre AuNPs desde el año 2005. Fuente Web of Science (Enero 2016).

Las AuNPs han sido ampliamente utilizadas en diversas aplicaciones, destacando el desarrollo de sensores [178], materiales adsorbentes [179], biocompatibles e inertes [180] con particular interés en el área de la medicina (i.e. nanomedicina) [181]. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que las AuNPs son tóxicas para organismos modelos tales como la *Drosophila melanogaster* (e.g. genotoxicidad) [180] e incluso en células

humanas [181]. En cuanto a las vías de transporte como contaminante en el medioambiente, el caso de las AuNPs es similar al de las AgNPs.

Al igual que las AgNPs, las AuNPs presentan un perfil de SPRB característico que varía con el tamaño, la forma y el estado de agregación de las partículas. Esta propiedad es aprovechada para desarrollar los denominados sensores plasmónicos. Ciertos compuestos (e.g. la espermina) inducen un cambio dependiente de la concentración de los mismos en la SPRB de las AuNPs, por lo que pueden ser determinados [178].

El número de citas sobre AuNPs en los últimos diez años ha crecido sostenida y significativamente (ver **Figura 15**). Comparado a las AgNPs (**Figura 13**), las AuNPs han sido más estudiadas y desde hace más tiempo (el número de citas para estas últimas es casi el doble). Por lo mismo, el desarrollo de metodologías de análisis ha sido realizado, en algunos casos, para AuNPs en primera instancia y luego extendido a AgNPs.

1.5.3.3 Métodos analíticos para estudiar NPs

En cuanto a caracterización de NPs se refiere, una gran variedad de métodos han sido propuestos. Como se ha mencionado, el tamaño de las partículas (promedio y distribuciones) es una propiedad fundamental que se relaciona con la funcionalidad de las mismas. Es de esta forma como las metodologías han buscado obtener información acerca de dicha propiedad, así como lograr separar las partículas. Las técnicas más utilizadas son la microscopía electrónica (TEM) y de barrido (SEM), relacionadas (e.g. microscopía de fuerza atómica, AFM) y la dispersión dinámica de la luz (DLS). Al mismo tiempo, se han realizado trabajos en lo que se estudia la estabilidad de las AgNPs (estados de agregación, coatings y destrucción por diferentes reactivos) en distintos medios. La espectrofotometría UV-Vis (a través de medidas de SPRB) permite rápidamente tener una idea al respecto y ha sido ampliamente utilizada. Teniendo en cuenta que el interés científico ha sido mayor en principio para las AuNPs, los primeros trabajos respaldan este hecho. La **Tabla 13** muestra algunas de las metodologías desarrolladas [182-190] para caracterizar NPs, mayoritariamente con el fin de lograr separaciones por tamaño, en los últimos 20 años. Cabe destacar el estudio de Pacioni y colaboradores [189] que permitió establecer una ecuación que permite pasar de tamaños promedios (i.e. diámetro) de partículas a concentraciones.

Para cuantificar las NPs (es decir, obtener su concentración) se utiliza habitualmente detección por espectrometría de masas. Esto significa que dicha concentración es dada como cantidad de plata (referida a masa), implicando, en alguna etapa, la transformación de las partículas a plata o Ag^+ . Por otro lado, existen pocos métodos que determinan NPs midiendo directamente alguna propiedad de las mismas (como la SPRB). Por otra parte, es cierto que por TEM se pueden medir las concentraciones a través de los tamaños. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones que se comentarán en secciones posteriores.

Tabla 13. Métodos analíticos para la caracterización de NPs en los últimos 20 años

Analito	Técnica	Estudio	Ref.
NPs metálicas	Filtración-FFF-ICP-MS	Separación por tamaños y detección de NPs (LOD 1-1000 ng/L)	[182]
AuNPs	Centrifugación-SEC-UV-Vis	Separación por tamaños y purificación de estructuras agregadas (dímeros, trímeros)	[183]
AuNPs	SPE-SEC-UV-Vis	Separación por tamaños	[184]
AgNPs ¹	CE-DAD	Separación por tamaños y formas, estudios de estabilidad	[185]
AuNPs	CE-MALDI-MS, CE-UV-Vis, CE-FLD	Separación por tamaños en muestras polidispersas	[186]
AgNPs	Fluorimetría (formación de oxazolina por reacción de Ag ⁺ y derivado de RB)	Determinación de Ag ⁺ (e indirecta de AgNPs, luego de oxidación a Ag ⁺), análisis de productos de consumo (LOD Ag ⁺ 0.13 µM)	[187]
AgNPs	CCC-UV-Vis	Separación por tamaños, estudios comparativos por SEM y UV-Vis	[188]
AuNPs	TEM	Relación entre el tamaño promedio de partícula y la concentración de NPs	[189]
AgNPs, NPs metálicas	AF4, UV-Vis, DLS, ICP-MS	Estudios de coatings, estados de agregación, cargas, pH en NPs	[190]
AgNPs	UV-Vis (redox Ag ⁺ y TMB)	Determinación Ag ⁺ (LOD 5.33 µM) en presencia de AgNPs, obtención rendimientos de las síntesis de AgNPs	Tesis
	Cap-LC-DAD, IT-SPME-Cap-LC-DAD	Caracterización de la adsorción de AgNPs en suelos, estudios de interferencias y comparativos con IR y microscopía	

¹también NPs no esféricas

NPs nanoparticulas, Ref. referencia, FFF fraccionamiento de campo-flujo, ICP-MS espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo, AuNPs nanoparticulas de oro, SEC cromatografía por exclusión de tamaños, UV-Vis espectrofotometría UV visible, SPE extracción en fase sólida, AgNPs nanoparticulas de plata, CE electroforesis capilar, DAD detector de fila de diodos, MALDI desorción/ionización por láser asistida por matriz, MS espectrometría de masas, FLD detector de fluorescencia, RB rodamina B, CCC cromatografía en contracorriente, SEM microscopía electrónica de barrido, TEM microscopía electrónica de transmisión, AF4 fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico, DLS dispersión dinámica de la luz, redox reacción de oxidación-reducción, TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina Cap-LC cromatografía líquida capilar, IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo, IR espectroscopía infrarroja

En la **Tabla 14** se pueden ver algunos de los métodos desarrollados [191-202] con el objetivo de determinar principalmente AgNPs (aunque en ocasiones también AuNPs). Se aprecia claramente que la técnica de detección más utilizada es la espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en su modo convencional o, últimamente, de partícula individual (SP-ICP-MS). En cuanto a técnicas de separación, se emplean principalmente la cromatografía líquida, la electroforesis capilar y el fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico (AF4), una variante del fraccionamiento de campo-flujo (FFF). Como etapa de pretratamiento de muestra, destaca la extracción en punto de nube (CPE) que permite preconcentrar NPs utilizando surfactantes. Todas las metodologías desarrolladas apuntan en la misma dirección: separar las NPs por tamaños y de la plata catiónica (especiación), al mismo tiempo que obtener señales que respondan a la concentración de las partículas. Algunas de estas metodologías van más lejos consiguiendo obtener señales analíticas que se asemejan a las distribuciones de tamaño de partícula que podrían obtenerse por TEM [200].

En esta Tesis, se han desarrollado metodologías basadas en la Cap-LC y la IT-SPME para el estudio de muestras acuosas con un enfoque distinto al de los trabajos citados previamente. A su vez, para controlar el rendimiento de síntesis de las AgNPs y por consiguiente, la cantidad de Ag^+ presente, se ha establecido un método espectrofotométrico de caracterización (ver **Tabla 13**). En dicho método, se aprovecha una reacción de oxidación-reducción de los cationes plata con la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), cuya forma oxidada presenta coloración azul y que puede aplicarse en presencia de AgNPs. Así, se puede asegurar que las síntesis de AgNPs han sido cuantitativas, eliminando la cantidad de Ag^+ como factor adicional que pueda interferir en la separación cromatográfica.

Ambos métodos cromatográficos desarrollados, Cap-LC-DAD e IT-SPME-Cap-LC-DAD (ver **Tabla 14**), responden a la concentración de AgNPs y, a diferencia de los estudios de la bibliografía, lo hacen midiendo una propiedad intrínseca de las partículas (i.e. su SPRB). Por un lado, el primero y más simple de los dos, permite predecir el tamaño promedio de una síntesis de manera sencilla, así como obtener información sobre parámetros relacionados con la funcionalidad y estabilidad de las mismas (viable también para NPs no esféricas en principio). Por otro lado, con el método basado en la IT-SPME-Cap-LC-DAD, se puede estudiar además el efecto del dispersante sobre las NPs, ya que se produce una separación por polaridad en el sistema. Sumado a esto, la sensibilidad aumenta (el capilar de IT-SPME permite procesar un mayor volumen de muestra) y otras NPs (e.g. AuNPs) pueden ser analizadas. Por último, las señales responden a cambios en el radio hidrodinámico lo que permite estudiar el efecto de los surfactantes catiónicos (otros ECs) como se verá más adelante.

Tabla 14. Métodos analíticos para la determinación de AgNPs en los últimos 10 años

Técnica	Estudio	LOD	Rec. (%)	Muestras	Ref.
CPE-ICP-MS	Preconcentrar AgNPs y especiación	6 ng/L	57-116	Aguas	[191]
HDC-ICP-MS	Separar tamaños y determinación	2.3 ng/mL	-	Aguas y lodos	[192] ^a
CPE-ICP-MS	Determinación y especiación	120 ng/kg	71.7-103	PPCPs	[193]
DA-SP-ICP-MS	Separar, especiar y determinar (distribuciones)	32 ag ^b	-	-	[194]
(UAE)-FFF-ICP-MS	Separar y determinar. Comparativa DLS y TEM.	6.7 µg/L	88-98	Pat. Ref.	[195]
AF4-ICP-MS	Comparativa técnicas. Separación,	2.5 µg/L	-	-	[196]
SP-ICP-MS	determinación y especiación	2 ng/L ^c	-	-	
Ext. Sur.-HPLC-ICP-MS	Separar, determinar y especiación	80 ng/L	86	Textil	[197] ^d
MEKC-ICP-MS	Separar, determinar y especiación	180 ng/L	72-100	PPCPs	[198] ^d
HPLC-ICP-MS (UV-Vis)	Separar, determinar y especiación	40 µg/kg	90	PPCPs	[199]
CE-ICP-MS	Separar, especiar y determinar (distribuciones)	-	88.2-95.2	Aguas	[200] ^d
HPLC-ICP-MS	Separar, determinar y especiación	19 ng/L	81.6-106.3	Aguas y PPCPs	[201] ^d
AF4-ICP-MS	Separar tamaños y determinación	6 µg/kg	99.1	Mat. Ref. NIST	[202] ^e
Cap-LC-DAD	Tamaños y concentraciones, estabilidad, funcionalidad, efecto de polaridad, radios h., comparativa DLS y TEM	1.61 ng/L	94.4-99.1	NPs comerciales	Tesis ^f
IT-SPME-Cap-LC-DAD		0.184 ng/L		Pat. Ref.	

^aAgNPs y NPs metálicas ^batogramo (10¹⁵ g) ^cdiámetro NPs ≥ 20 nm ^dAgNPs y AuNPs ^esólo AuNPs (esféricas y no) y AuNPs

AgNPs nanopartículas de plata, *AuNPs* nanopartículas de oro, *NPs* nanopartículas, *LOD* límite de detección, *Rec.* recuperación, *Ref.* referencia, *CPE* extracción en punto de nube, *ICP-MS* espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo, *HDC* cromatografía hidrodinámica, *PPCPs* productos farmacéuticos y de cuidado personal, *DA* digestión ácida, *SP* partícula individual (modo ICP-MS), *UAE* extracción asistida por ultrasonidos, *FFF* fraccionamiento de campo-flujo, *DLS* dispersión dinámica de la luz, *TEM* microscopía de transmisión electrónica, *Pat. Ref.* patrones de referencia, *AF4* fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico, *Ext. Sur.* extracción con surfactantes, *MEKC* cromatografía electrocinética micelar, *HPLC* cromatografía líquida de alta resolución, *UV-Vis* espectrofotometría UV visible, *CE* electroforesis capilar, *NIST* Instituto Nacional de Normas y Tecnología, *Cap-LC* cromatografía líquida capilar, *IT-SPME* microextracción en fase sólida en tubo

Ambos métodos propuestos han sido aplicados para estudiar las AgNPs en otra matriz ambiental: los suelos. Se ha conseguido caracterizar el grado de retención de las NPs en un determinado suelo (ver **Tabla 13**) mediante un procedimiento que será detallado posteriormente. Para obtener relaciones entre la capacidad adsorbente de cada suelo y sus propiedades fisico-químicas, todos los suelos en cuestión fueron caracterizados por espectroscopía infrarroja (IR) y por microscopía (SEM y óptica). La microscopía óptica demostró ser una herramienta útil para caracterizar suelos (y también sedimentos) obteniendo rápidamente la composición por tamaño de partícula de los mismos.

1.5.4 Surfactantes

Si bien no se ha desarrollado un método específico para determinar surfactantes (o tensioactivos) en muestras medioambientales, estos compuestos pueden ser estudiados ya que interactúan (específicamente, surfactantes catiónicos cuaternarios [203]) con las AgNPs, para las cuales se han establecido las metodologías de análisis discutidas en la sección precedente. Por lo mismo, es pertinente comentar las principales características de estos contaminantes.

Los surfactantes son agentes químicos que influyen en la superficie de contacto de dos fases por medio de la tensión superficial. El término que proviene del anglicismo “surfactant” quiere decir “agente activo de superficie”. Generalmente están compuestos por una cabeza polar o hidrofílica (cargada o no) y una cola hidrocarbonada apolar o hidrofóbica. Se suelen clasificar dependiendo de su comportamiento iónico en disolución: aniónico, catiónico, no-iónico y anfótero (o zwitteriónico) [204]. La **Tabla 15** muestra algunos ejemplos para cada tipo.

Tabla 15. Clasificación de surfactantes y ejemplos representativos de cada tipo.

Tipo	Ejemplos
Aniónico (carga negativa)	dodecilsulfato sódico (SDS) alquil sulfatos (AS)
Catiónico (carga positiva)	bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) cloruro de benzalconio (BZKC o BAC)
No-iónico (sin carga)	alquilfenoles etoxilados (APE) alcoholes etoxilados (AE)
Anfótero (cargas negativa y positiva)	óxidos de amina (AO) derivados de betaínas

Estos compuestos poseen excelentes propiedades de solubilización y de detergencia debido a que forman micelas en disolución por poseer grupos polares y apolares. Esto ocurre al excederse la concentración micelar crítica (CMC) del surfactante. Si no se alcanza, estos compuestos existen como monómeros. Es por estas propiedades que se emplean en detergentes, PPCPs, pesticidas, pinturas, entre otros productos [205].

Al ser ampliamente utilizados, los surfactantes alcanzan los diversos compartimentos ambientales, luego de acumularse en los influentes de las EDARs y ser dispersados a través de los efluentes de estas estaciones. Estas sustancias suelen biodegradarse con facilidad por

actividad microbiana [6], proceso que depende tanto de sus propiedades químicas como de las físicas del medio ambiente [206]. Las que no lo hacen pueden alcanzar aguas superficiales, suelos y sedimentos (a los suelos pueden llegar directamente a través de la aplicación de pesticidas). En aguas, la alta dilución provoca que los surfactantes se encuentren en concentraciones bajas y a estos niveles sus efectos tóxicos se ven minimizados [6]. En suelos y sedimentos, son mayoritariamente adsorbidos disminuyendo su impacto ambiental [205]. No obstante, por su empleo masivo, estos ECs deben ser monitorizados lo que implica el desarrollo de los métodos analíticos correspondientes (hasta la fecha, la mayoría basados en CE, HPLC y GC [203]).

La toxicidad de los surfactantes está demostrada en microorganismos [6]. Por ejemplo, los surfactantes aniónicos pueden inducir cito y genotoxicidad. Existen muchos estudios toxicológicos en organismos acuáticos (algas, invertebrados, peces); sin embargo, para organismos terrestres el panorama es el opuesto, siendo sumamente necesaria la investigación al respecto [205]. Por otra parte, a pesar de que la biodegradación de estos compuestos permite que una atenuación importante de la exposición ambiental de los mismos, este proceso puede provocar especies intermedias como el nonilfenol (en el caso de los APE), mucho más tóxico (considerado entre los EDCs) que su precursor y que ha sido incluido en la lista de contaminantes prioritarios de la UE [29].

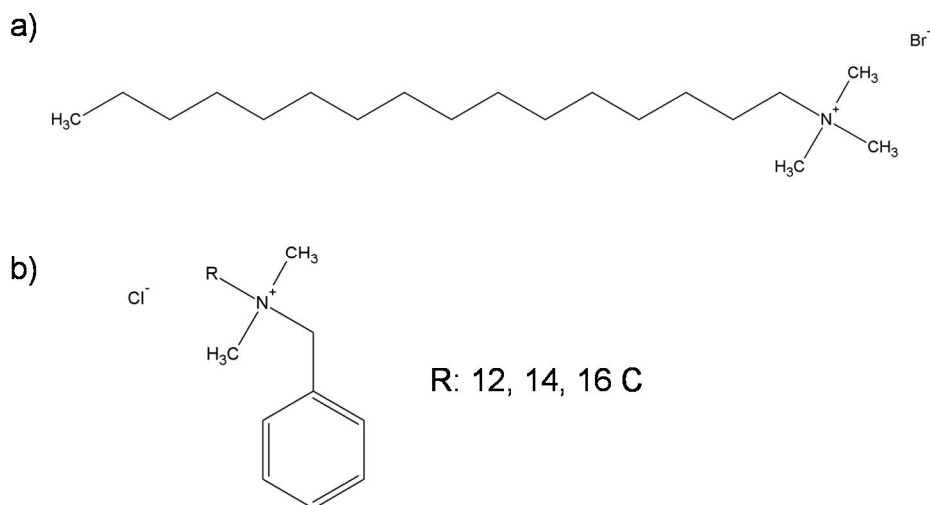


Figura 16. Estructura química de: a) CTAB y b) BZKC (R representa una cadena alifática de 12, 14 o 16 carbonos).

En la presente Tesis, se ha evaluado la capacidad del método de IT-SPME-Cap-LC-DAD para identificar dos surfactantes catiónicos cuaternarios, CTAB y BZKC, cuyas estructuras se muestran en la **Figura 16**. Dicho sea de paso, el método en cuestión utiliza un surfactante aniónico en su fase móvil ya que transporta eficazmente a las AgNPs [197]. Estos surfactantes catiónicos cuaternarios inducen la agregación de las partículas mediante el efecto hidrofóbico, produciéndose estructuras de mayor tamaño y disminuyendo la absorción en el máximo de SPRB. En la bibliografía se ha estudiado este efecto mediante UV-Vis [203], pero en cuanto a análisis relacionado con AgNPs se refiere, resulta más adecuado el empleo de un sistema cromatográfico con detección espectrofotométrica (lo que se explicará más adelante). Por su parte, se empleó el método de Cap-LC con el objetivo de evaluar la capacidad de una determinada síntesis de AgNPs para interactuar con los surfactantes estudiados en función de la estabilidad de las partículas.

1.5.5 PAHs y derivados

Los PAHs han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la USEPA [14] y la UE [13], siendo objeto de estudio intensivo en las distintas matrices ambientales desde hace bastante tiempo [207]. Estrictamente no pueden ser clasificados como ECs. Sin embargo, estas sustancias poseen un variado tipo de productos derivados, los cuales no están regulados de la misma forma y suscitan una investigación más reciente. Independientemente, en el presente trabajo, se han elegido los PAHs como analitos modelo para el desarrollo de metodologías que permitan analizar contaminantes principalmente en suelos y sedimentos, así como se han realizado estudios preliminares sobre ellos y sus derivados para posterior análisis en aire.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), también conocidos como hidrocarburos poliaromáticos o hidrocarburos aromáticos polinucleares, son compuestos químicos constituidos por dos o más anillos aromáticos fusionados simples (i.e. sin sustituyentes ni heteroátomos). La **Tabla 16** muestra los PAHs analizados en esta Tesis. En su estado puro, estas sustancias son sólidos de color variable (incoloros, blancos o amarillos verdosos) y, en general, inodoros (aunque de poseer olor, éste es leve y agradable).

Estos contaminantes pueden originarse por causas naturales o antropogénicas. Entre las fuentes de emisión naturales se encuentran las erupciones volcánicas y la biosíntesis directa producida por bacterias y plantas. Por otra parte, las fuentes asociadas a la actividad del hombre se clasifican en dos grupos:

- Fuentes pirogénicas, caracterizadas por combustiones y/o pirólisis incompletas a altas temperaturas de combustibles fósiles.
- Fuentes petrogénicas, derivadas de la industria del petróleo.

Los PAHs están ampliamente extendidos en el medio ambiente. Se distribuyen como mezclas en el aire, partículas en suspensión, aguas, suelos, sedimentos y biota. Su semivolatilidad les permite viajar largas distancias antes de regresar a tierra y redistribuirse en los suelos (vía lluvias o sedimentación) o en las superficies de ríos y lagos. Debido a que muchas de estas sustancias son productos de la actividad del hombre, el humo emitido por vehículos e industrias, quema de combustibles y agrícola, incendios y almacenes de desechos tóxicos contamina las matrices ambientales y los organismos se ven expuestos rápidamente a ellos.

Tabla 16. Estructura química de los PAHs estudiados. Los números denotan el pertenecer a la lista de contaminantes prioritarios de: (1) USEPA, (2) UE y (3) si están clasificados como sustancias peligrosas en la lista de la UE.

Nombre	Estructura Química	Nombre	Estructura Química	Nombre	Estructura Química
Acenafeno ¹ (Acn)		Antraceno ^{1,2,3} (Ant)		Benzo(a)antraceno ¹ (BaA)	
Benzo(a)pireno ^{1,2,3} (BaP)		Benzo(b)fluoranteno ^{1,2,3} (BbF)		Benzo(ghi)perileno ^{1,2,3} (BghiP)	
Benzo(k)fluoranteno ^{1,2,3} (BkF)		Criseno ¹ (Cri)		Dibenzo(a,h)antraceno ¹ (DahA)	
Fenantreno ¹ (Fen)		Fluoranteno ^{1,2} (Flr)		Fluoreno ¹ (Fl)	
Indeno(1,2,3-cd)pireno ^{1,2,3} (IcdP)		Naftaleno ^{1,2} (Naf)		Pireno ¹ (Pr)	

La toxicidad de estos compuestos es elevada: algunos han sido descritos como cancerígenos, agentes mutagénicos y EDCs desde ya largo tiempo. Pertenecen a la familia de los POPs permaneciendo en el ambiente por tiempos prolongados con sus propiedades tóxicas inalteradas. El dibenzo(a,h)antraceno (DahH) es particularmente tóxico [208].

Además, estos contaminantes tienden a bioacumularse en organismos debido a su liposolubilidad, estabilidad, persistencia y baja polaridad. Por consiguiente, la biomagnificación es un problema asociado a ellos. Algunos PAHs no se queman, se descomponen en agua o se volatilizan fácilmente. En la **Tabla 17** se presentan algunas propiedades de estos compuestos. Cabe resaltar el elevado valor de $\log K_{ow}$ que da cuenta de la gran afinidad por los PAHs por los tejidos grasos de un organismo (el máximo valor correspondiente al DahA). La presión de vapor se relaciona con la volatilidad (cantidades directamente proporcionales) y es mayor para los PAHs con menor masa molecular. A medida que la masa molecular aumenta, disminuyen los puntos de fusión y ebullición (ambas propiedades con valores altos para esta familia de compuestos), así como también la solubilidad en agua (que es muy baja para los PAHs). Por su parte, los valores de $\log K_{oc}$ (que representan la adsorción en suelos normalizada por el contenido de materia orgánica) son muy altos lo que presupone que es más probable encontrar estos contaminantes retenidos en los suelos y sedimentos que en el agua [209].

Tabla 17. Propiedades físico-químicas de algunos de los PAHs (Fen, Flr, Pir, BaA, BbF, BkF, IncdP, BghiP, DahA) [208,209].

Propiedad	Grupo de PAHs
Mm (g/mol)	178-278
Solubilidad (g/100 mL)	$1.18 \cdot 10^{-4}$ - $2.6 \cdot 10^{-8}$
Log K_{ow}	4.45-6.84
Log K_{oc}	3.72-7.29
P_f (°C)	99.5-278.3
P_{eb} (°C)	340-536
P_v (mmHg)	$1 \cdot 10^{-10}$ - $2.5 \cdot 10^{-6}$

Mm masa molecular P_f punto de fusión P_{eb} punto de ebullición P_v presión de vapor

Por lo tanto, es de sumo interés desarrollar metodologías para analizar PAHs en suelos y sedimentos, donde estos compuestos son fuertemente adsorbidos por dichas matrices. La fuerza de la adsorción correspondiente dependerá del tiempo transcurrido desde la exposición a estos contaminantes [210]. Como se ha visto anteriormente (valores de $\log K_{oc}$), los PAHs poseen afinidad por la materia orgánica del medio, por lo que se encuentran

mayoritariamente en la fracción húmica del suelo. A medida que el número de anillos fusionados aumenta, también lo hace la fuerza de la retención [209].

Tal es la preocupación por estos contaminantes, que en España, el gobierno ha establecido límites máximos aceptables para los PAHs en los suelos dependiendo del uso que se le dé a los mismos. En la **Tabla 18** se muestran los niveles de reglamentación para los PAHs estudiados en suelos, así como en organismos del mismo y otras matrices [211].

Tabla 18. Límites máximos aceptables de PAHs en suelos destinados a diferentes usos y en organismos en distintos compartimentos del medio ambiente.

PAHs	Protección de la salud humana mg/kg peso seco			Protección de los ecosistemas mg/kg peso seco		
	Uso industrial	Uso urbano	Otros usos	Organismos del suelo	Organismos acuáticos	Vertebrados terrestres
Acn	100	60	6		0.02	4.85
Ant	100	100	45		0.01	22
BaA	20	2	0.2	3.8	0.01	
BaP	2	0.2	0.02	0.15	0.01	
BbF	20	2	0.2			
BghiP						
BkF	100	20	2			
Cri	100	100	20			
DahA	3	0.3	0.03			
Fen						
Flr	100	80	8	1	0.03	1.96
Fl	100	50	5	0.22	0.02	2.84
IncdP	30	3	0.3			
Naf	10	8	1			
Pir	100	60	6		0.01	1.2

Uso industrial del suelo: aquel que tiene como propósito principal el de servir para el desarrollo de actividades industriales, excluidas las agrarias y ganaderas.

Uso urbano del suelo: aquel que tiene como propósito principal el de servir para el desarrollo de actividades de construcción de viviendas, oficinas, equipamientos y dotaciones de servicios, y para la realización de actividades deportivas y recreativas.

Otros usos del suelo: aquellos que, no siendo ni urbano ni industrial, son aptos para el desarrollo de actividades agrícolas, forestales y ganaderas.

De lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que los PAHs son compuestos que siguen generando preocupación e interés científico. Por lo mismo, se utilizan principalmente

como compuestos diana en investigación (curiosamente, también se emplean de forma minoritaria en la fabricación de colorantes, pesticidas, plásticos, entre otros). Aunque se conocen muchos de sus efectos en mamíferos (e.g. ratones), faltan estudios sobre los efectos en humanos luego de haber sido expuestos a diferentes dosis de PAHs. Lo cierto es que estas sustancias pueden entrar en el organismo de un individuo por acciones tan simples como respirar aire contaminado, ingerir alimentos que hayan sido expuestos o por contacto a través de la piel (el sistema excretor suele eliminar estas cantidades en algunos días) [212]. Sumado a todo lo dicho, estos contaminantes pueden generar derivados, mucho menos estudiados y regulados, pero con igual carácter tóxico.

Los derivados de los PAHs se forman a partir de las diferentes reacciones (químicas y fotoquímicas) atmosféricas de los PAHs con especies tales como oxígeno, ozono, radicales hidroxilos, ácidos nítrico y sulfúrico, óxidos de nitrógeno y de azufre. Estos derivados puede ser tan tóxicos como sus precursores: por su parte, el 1-nitropireno es un agente mutagénico que forma aductos con el ADN; la quinolina es un hepatocarcinógeno en ratas y ratones [213].

Entre estos compuestos encontramos numerosas familias, entre las cuales se encuentran: los aza-arenos (AZAs), los PAHs nitrogenados (NPAHs), oxigenados (OPAHs) e hidroxigenados (OHPAHs, pudiendo ser clasificados como OPAHs). Muchas de estas sustancias pueden llegar a ser más peligrosas que los PAHs [214]. En la **Figura 17** están representados los derivados de PAHs más simples que pueden formarse.

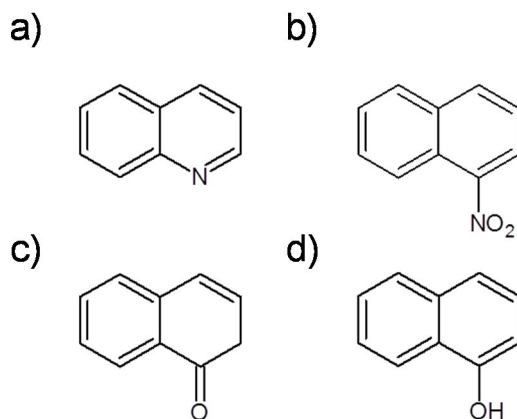


Figura 17. Estructura química de: a) quinolina (de los AZAs), b) 1-nitronaftaleno (de los NPAHs), c) 1(2H)-naftalenona (de los OPAHs) y d) 1-hidroxinaftaleno (de los OHPAHs). Nota: para c) la notación (2H) simboliza los 2 hidrógenos menos respecto al naftaleno.

Los NPAHs, OPAHs y OHPAHs son derivados que poseen 1 o más grupos funcionales de tipo nitro, carbonilo e hidroxilo respectivamente, en tanto que los AZAs poseen algún anillo con un nitrógeno en lugar de un carbono (existen combinaciones de los mismos). Las fuentes para dichos derivados son las mismas que para PAHs (principalmente combustión incompleta de compuestos a base de carbono), ya que estos últimos son los compuestos precursores. No obstante, los AZAs pueden también formarse a partir de toxinas microbianas o de alcaloides [215]. Las reacciones fotoquímicas de oxidación (con radicales libres) [216] y la biodegradación [217] sobre los PAHs son las principales vías de formación de NPAHs, OPAHs y OHPAHs. Para ejemplificar, en la **Figura 18** se muestra un mecanismo simple para la formación de 1-nitronaftaleno y 1-hidroxinaftaleno por acción de radicales hidroxilos y dióxido de nitrógeno [214].

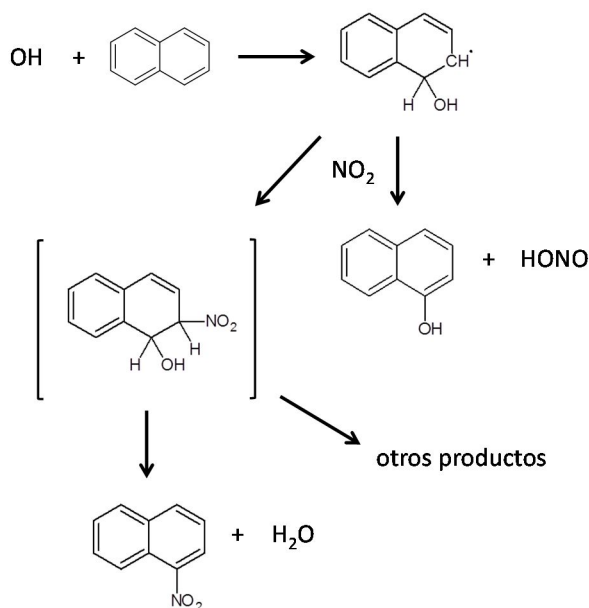


Figura 18. Mecanismo de formación del 1-hidroxinaftaleno y el 1-nitronaftaleno por acción de radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno.

En la actualidad, existe una falta de información sobre estos contaminantes en el medio: estudios de seguimiento, ocurrencia y toxicología son altamente necesarios para establecer, por ejemplo, patrones de distribución espacial y composición, así como riesgo de cáncer en los organismos (en China, se han realizado análisis de polvo y suelo urbano obteniéndose

resultados que confirman la presencia de estos compuestos, con lo que las personas están expuestas) [216]. También, desarrollar métodos de análisis lo suficientemente sensibles es de sumo interés, ya que los derivados se encuentran presentes en menor medida que los PAHs. Son más polares (presencia de grupos funcionales oxigenados y nitrados), aunque las características de volatilidad, solubilidad y de adsorción no distan mucho de las de sus precursores [218]. Los derivados de PAHs estudiados en el presente trabajo se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Derivados de PAHs, clasificados por familias, estudiados en la presente Tesis.

Familia	Analitos
AZAs	2,4-dimetilquinolina
NPAHs	1-nitronaftaleno 1-nitropireno 1,5-dinitronaftaleno 1,8-dinitronaftaleno 2-metil-1-nitronaftaleno 2-nitronaftaleno 2-nitropireno 3-nitrofluoranteno 5-nitroacenafteno 6-nitrocriseno 7-nitrobenzo(a)antraceno 9-nitroantraceno
OPAHs	9-fluorenona
OHPAHs	1,2-dihidroxi-naftaleno 9-hidroxi-antraceno 9-hidroxi-fluoreno
AZAs-NPAHs	6-nitroquinolina

1.5.5.1 Métodos de extracción y de determinación de PAHs y derivados

Teniendo en cuenta la afinidad de los PAHs a ser retenidos por suelos y sedimentos, el interés del presente trabajo ha sido desarrollar o mejorar metodologías analíticas que involucren técnicas de extracción innovadoras que permitan determinar a estos contaminantes a niveles de ng/g. Se han acoplado a HPLC con detector de fluorescencia, ya que estas sustancias son altamente fluorescentes, pudiendo alcanzar una elevada sensibilidad. Se ha contrastado con un método basado en la GC-MS. En cuanto a los derivados de PAHs, se realizó un estudio preliminar y comparativo utilizando GC y detección de MS en distintas modalidades en búsqueda de las condiciones óptimas que

permitieran su análisis (estos compuestos al igual que sus precursores se retienen en las partículas en suspensión del aire).

La determinación a niveles traza de PAHs en suelos y sedimentos se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando la extracción Soxhlet (seguida de una etapa de limpieza por SPE) o extracción líquido-líquido (LLE). En estas técnicas, sobretodo en la extracción Soxhlet [219], se utilizan elevadas cantidades de disolvente (por consiguiente, de desechos) y el tiempo requerido es prolongado. Por lo mismo, muchos esfuerzos se han realizado en el último tiempo por minimizar el consumo de disolventes, reactivos y desechos empleando técnicas miniaturizadas para la determinación de todo tipo de contaminantes ambientales como la SPME con fibras y capilares (i.e. IT-SPME), la SBSE, la microextracción líquido-líquido (LLME) y su variante dispersiva (DLLME), microextracción con gota suspendida (SDME) y microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME). En muchas ocasiones, estas técnicas permiten el análisis directo de trazas de OCs en muestras gaseosas, líquidas y viscosas; sin embargo, para muestras sólidas y semi-sólidas se requiere una etapa previa que permita liberar los analitos diana de la matriz en que se encuentran. Por consiguiente, se han propuesto tratamientos modernos para matrices sólidas y semi-sólidas tales como la extracción con líquidos presurizados (PLE), también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), la UAE, la MAE, la MSPD, entre otras.

En la **Tabla 20** se pueden ver algunas de las metodologías propuestas [220-229] en los últimos diez años para la determinación de PAHs en el medio ambiente con sus respectivas etapas de extracción. El método desarrollado en la presente Tesis está basado en la UAE, que en el contexto de la química verde (i.e. respetuosa con el medio ambiente) es una de las técnicas más prometedoras. El principio es simple: se aplican ultrasonidos con frecuencias apropiadas que producen presiones negativas y cavidades (burbujas) en la muestra. Cuando dichas burbujas no pueden absorber más energía, implosionan (lo que se conoce como cavitación) creando puntos de altas temperaturas y presión. Con esto se facilita, la extracción de los analitos de la matriz. Comparando los parámetros analíticos, el presente método permite realizar análisis traza (nivel de ng/g) de PAHs disminuyendo al máximo la manipulación, el tiempo, el consumo de reactivos y disolventes.

Por ejemplo, las metodologías basadas en la PLE requieren mayor manipulación y etapa de limpieza (aunque se ha realizado el acoplamiento de PLE-SPE [225]). Algunos métodos requieren sistemas sofisticados y complejos [226-228]. Existe otro procedimiento en la bibliografía para determinar PAHs en suelos empleando ultrasonidos [229] (para aguas, también se han descrito [230,231]), pero requiere dos extracciones consecutivas (dos UAE). En definitiva, las ventajas que ofrece la metodología desarrollada en esta Tesis es que no necesita etapas adicionales (evaporaciones, múltiples extracciones) y requiere instrumentación sencilla.

Tabla 20. Métodos analíticos para la determinación de PAHs en suelos y sedimentos en los últimos 10 años

Pretratamiento de muestra/clean-up	Técnica	LOD	LOQ	Rec. (%)	Ref.
MSPD- <i>evaporación</i> / -	HPLC-FLD	0.004-0.2 ng/g	0.01-0.6 ng/g	94.3-102.6	[220]
MAE-saponificación / SPE	HPLC-FLD	0.1-4 ng/g	0.4-10 ng/g	68.2-98.7	[221]
PHWE-SPME / -	GC-MS	0.4-15 µg/kg	1.2-51 µg/kg	32-120	[222]
MAE / SPE	LC-APCI-MS	1.1-380 ng/g	11-390 ng/g	46.9-102.3	[223]
PLE / SPE	GC-MS	24.1-35.9 µg/kg	-	65.6-113.2	[224]
PLE / SPE (un paso)	GC-MS	0.05-0.77 ng/g	-	71.6-102	[225]
FA-HLLME / -	GC-FID	24-38 µg/kg	-	88.3-121.7	[226]
Vac-HS-SPME / -	GC-MS	0.003-0.795 ng/g	-	-	[227]
CHA-HS-SPME / -	GC-FID	0.47-0.89 ng/g	1.2-2.9 ng/g	-	[228]
UAE-SPME (fibra) / -	GC-MS	2-20 ng/g	15-45 ng/g	79.3-88.6	[229]
UAE / -	IT-SPME-HPLC-FLD	0.03-0.5 ng/g	0.1-1.67 ng/g	75-110	Tesis

PAHs hidrocarburos policíclicos aromáticos, LOD límite de detección, LOQ límite de cuantificación, Rec. Recuperación, Ref. Referencia, MSPD dispersión de la matriz en fase sólida, HPLC cromatografía líquida de alta resolución, FLD detector de fluorescencia, MAE extracción asistida por microondas, SPE extracción en fase sólida, PHWE extracción con agua caliente presurizada, SPME microextracción en fase sólida, GC cromatografía de gases, MS espectrometría de masas, APCI ionización química a presión atmosférica, LC cromatografía líquida, PLE extracción con líquidos presurizados, FA-HLLME microextracción líquido-líquido homogénea asistida por flotación, FID detector de ionización de llama, Vac-HS-SPME microextracción en fase sólida en espacio de cabeza, CHA-HS-SPME microextracción en fase sólida en espacio de cabeza asistida por enfriamiento-calentamiento.

Además, se ha adaptado y optimizado otra metodología para analizar PAHs en suelos y sedimentos. Dicha metodología se basa en un procedimiento que involucra la MSPD acoplada a IT-SPME-HPLC-FLD para determinar PAHs en biota y desarrollado por MINTOTA [73]. La MSPD, técnica con creciente aceptación en el análisis de muestras sólidas, semi-sólidas y viscosas [232], consiste en triturar una porción de la muestra mezclada con un material sólido abrasivo, típicamente una fase extractiva de SPE. Dicho proceso rompe la estructura de la muestra y la dispersa en la fase extractiva. Luego, la mezcla obtenida se dispone en un cartucho y los analitos pueden ser desorbidos con el disolvente adecuado. Es un proceso simple. No obstante, la fase extractiva no está carente de interferentes y requiere un tratamiento previo para eliminarlos. Empleando ultrasonidos y lavados con mezclas de disolventes orgánicos, se ha logrado minimizar las interferencias de manera significativa.

En lo que respecta a los derivados de PAHs, la técnica más empleada para la determinación de estos contaminantes en aire es la GC acoplada a MS realizando una extracción por PLE [233,234] o SPE [235] (aunque métodos más complejos como UPLC-APCI-MS/MS también se han descrito [236]). Siendo relativamente reciente el estudio de estas sustancias, no se conoce del todo su comportamiento en las diferentes matrices. En cuanto a análisis por GC, el detector suele operar en modo de impacto electrónico (EI) (las discusiones pertinentes se llevarán a cabo más adelante). Sin embargo, algunos autores sostienen que, sin emplear una preconcentración considerable, no se obtiene la sensibilidad requerida para cuantificar a los derivados de PAHs y se sugiere emplear el modo de ionización química (CI) [237]. En base a esto, se realizó un estudio comparativo en donde se utilizó la GC acoplada a MS (con EI o CI) y MS/MS (EI) para seleccionar, de manera preliminar, la metodología que brinde los mejores parámetros analíticos.

Capítulo 2.

OBJETIVOS

El problema de la contaminación ambiental es de una elevada complejidad ya que, además de la gran cantidad de sustancias tóxicas que se analizan y monitorizan en el presente, cada día se originan o se detectan otras y por consiguiente, las soluciones correspondientes parecen ser inalcanzables. La actividad humana en todo los sectores genera OCs (algunos de ellos, ECs) que ponen en riesgo a las diferentes formas de vida a corto, medio y largo plazo. Es más, en algunos casos sólo se han descubierto recientemente los efectos tóxicos de determinados compuestos (pudiendo haber existido exposición a ellos).

La legislación a nivel europeo, así como su transposición estatal y autonómica, buscan regular los contaminantes en general de manera progresiva, estableciendo una lista de sustancias prioritarias que pueden ser objeto de modificación y en donde los ECs, luego de los estudios pertinentes, puedan ser incluidos. Todo esto se realiza con el fin de lograr un marco común tanto en Europa (siendo la DMA un claro ejemplo de ello) como en las diferentes divisiones administrativas de cada país.

Sumado a este panorama adverso y a la normativa imperante, la Química Analítica se enfrenta con numerosos inconvenientes. Cada matriz medioambiental (agua, aire, biota, suelos y sedimentos) representa una dificultad por sí misma debido a que posee características particulares que suponen la adopción de una determinada estrategia analítica para estudiar uno o varios analitos contenidos en ella. Por otra parte, ciertos contaminantes se encuentran a niveles traza lo que requiere técnicas de elevada sensibilidad y selectividad. Por lo tanto, desarrollar metodologías eficientes, innovadoras y prácticas para caracterizar, identificar, determinar y por lo tanto, monitorizar OCs (incluidos los ECs) es de una necesidad imperiosa.

En este marco, la presente Tesis tiene como objetivo principal el desarrollo de nuevas metodologías que permitan el análisis principalmente de ECs. Para lograr ello, los objetivos específicos se describen a continuación:

- Desarrollar un método analítico basado en el novedoso acoplamiento de la IT-SPME con la nano-LC utilizando fases adsorbentes constituidas por nanomateriales y polímeros para su aplicación en la determinación del diclofenaco, como EC modelo, en aguas superficiales y muestras farmacéuticas.
- Desarrollar un procedimiento analítico basado en la Magnético-IT-SPME acoplada a Cap-LC haciendo uso de un nanomaterial magnético adsorbente patentado por MINTOTA para determinar OCs, en este caso, pesticidas que comprenden OPs y triazinas (dirigido a TBA como EC) en aguas superficiales y residuales.
- Evaluar la capacidad extractiva del nanomaterial magnético anteriormente mencionado mediante la MSPE y su posible uso en métodos de remediación de aguas.

- Establecer un método espectrofotométrico de caracterización de AgNPs (de los ECs más recientes) en términos de rendimiento de síntesis determinando la plata catiónica, en presencia de NPs, mediante reacción con la TMB.
- Desarrollar nuevas herramientas analíticas basadas en la Cap-LC acoplada o no a IT-SPME con detección espectrofotométrica (i.e. DAD) para caracterizar NPs metálicas (AgNPs y AuNPs esféricas, así como potencialmente AgNPs no esféricas) en función de su tamaño promedio, funcionalidad y estabilidad, así como evaluar el efecto del dispersante (por separación por polaridad), todo lo anterior con medidas que responden a la concentración de las nanopartículas.
- Evaluar la técnica para caracterizar NPs descrita previamente como posible método de identificación (en primera instancia) de surfactantes catiónicos cuaternarios (grupo de ECs).
- Caracterizar la adsorción de AgNPs en diferentes suelos y establecer relaciones entre las propiedades de esta compleja matriz y la fuerza de retención mediante Cap-LC-DAD e IT-SPME-Cap-LC-DAD.
- Proponer un método basado en la microscopía óptica para la rápida caracterización de suelos y sedimentos en función del tamaño de partícula.
- Mejorar una metodología para determinar PAHs en sedimentos basada en la MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD mediante el lavado del material adsorbente abrasivo (de la etapa de la MSPD) utilizando solventes orgánicos y UAE.
- Desarrollar un método analítico combinando UAE e IT-SPME-HPLC-FLD para cuantificar PAHs en sedimentos a niveles de ng/g.
- Contrastar los resultados obtenidos para PAHs utilizando un método de GC-MS que puede ser empleado en el análisis de muestras de aire utilizando muestreadores pasivos y como etapa de pretratamiento de muestra la PLE.
- Realizar un estudio comparativo entre metodologías de GC con diferentes espectrómetros de masas (MS y MS/MS, modalidades EI e CI) en el análisis de los derivados de PAHs.

El desarrollo de esta Tesis ha sido posible gracias al contrato Atracció de Talent (y estancia) y a los proyectos concedidos al grupo de investigación MINTOTA:

- Contrato de doctorado de la Universidad de Valencia en el marco del subprograma “Atracció de Talent” financiada por el programa de ayudas para la formación de personal investigador de carácter predoctoral. Valencia, España. Periodo: 01/01/12-31/12/15 (4 años).
- Ayuda para estancias cortas de beneficiarios de los programas de formación de personal investigador de carácter predoctoral del Vicerrectorado de Investigación y Política

Científica de la Universidad de Valencia. Lugar de realización: Universidad de Estrasburgo (Instituto de Química y Procedimientos para la Energía y el Medio Ambiente, ICPEES), grupo a cargo del Profesor Doctor Maurice Millet. Estrasburgo, Francia. Periodo: 01/04/15-31/07-15 (4 meses).

- Proyecto CTQ2011/26760, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), titulado: “Nuevas estrategias de análisis en técnicas cromatográficas miniaturizadas que incorporan la microextracción en fase sólida en tubo con nuevos (nano)materiales”. Periodo: 01/01/12-31/12/14 (3 años).
- Proyecto GVPROMETEO2012-045, concedido por la Generalitat Valenciana a grupos de investigación de excelencia de la Comunidad Valenciana, titulado: “Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ”. Periodo: 2012-2015.
- Proyecto de Investigación. Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) Betelgeux-SL. “Procesos de alto rendimiento para la higiene de circuitos en industrias lácteas mediante desarrollo de (nano)materiales y nuevas tecnologías químicas CIP-NANOTEC”. Periodo: 01/01/12-01/01/14 (2 años).
- Proyecto GVACOMP2013-155, concedido por la Consellería de Educación de la Generalitat Valenciana, titulado: “Nuevas estrategias de análisis en técnicas cromatográficas miniaturizadas que incorporan la microextracción en fase sólida en tubo con nuevos (nano)materiales. Aplicación al estudio de contaminantes”. Periodo: 01/01/13-31/12/13 (1 año).
- Proyecto CTQ2014-53916-P, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) en el marco del Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia (Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento), titulado: “Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de técnicas de cromatografía líquida miniaturizada en línea: nanopartículas, contaminación secundaria”. Periodo: 2015-2017.

Las publicaciones que dan lugar a esta Tesis se detallan a continuación:

- Moliner-Martínez, Y., **González-Fuenzalida, R. A.**, Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P., Verdú-Andrés, J. (2012). Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments. *Journal of Chromatography A*, 1263, 43–50.
- **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., González-Béjar, M., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., Pérez-Prieto, J., Campins-Falcó, P. (2013). In situ

- colorimetric quantification of silver cations in the presence of silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 85, 10013–10016.
- Antunes-Galvao, J., Matthiensen, A., Oetterer, M., Moliner-Martínez, Y., **González-Fuenzalida, R. A.**, Muñoz-Ortuño, M., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P. (2014). Chapter 10. Determination of Ammonia in Water Samples, 249–281. *Handbook of Water Analysis 3rd edition*. CRC Press (Ed.), New York.
 - Moliner-Martínez, Y., Vitta, Y., Prima-García, H., **González-Fuenzalida, R. A.**, Ribera, A., Campins-Falcó, P., Coronado, E. (2014). Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 2211–2215.
 - **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Prima-García, H., Ribera, A., Campins-Falcó, P., Zaragoza, R. J. (2014). Evaluation of superparamagnetic silica nanoparticles for extraction of triazines in magnetic in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Nanomaterials*, 4, 242–255.
 - **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Jornet-Martínez, N., Campins-Falcó P. (2015). Microextraction with phases containing nanoparticles. *Bioanalysis*, 7, 2163–2170.
 - **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Parada-Artigues, V., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P. (2016). New tools for characterizing metallic nanoparticles: AgNPs, a case study. *Analytical Chemistry*, 88, 1485–1493.
 - **González-Fuenzalida, R. A.**, López-García, E., Moliner-Martínez, Y., Campins-Falcó, P. (2016). Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1432, 17–25.
 - **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by combining ultrasound-assisted extraction and in-valve in-tube solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Enviado.
 - **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Escribano-López, I., Campins-Falcó, P. Study of the adsorption interaction between AgNPs and different soil matrices by in tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. Pendiente de envío.

Durante el tiempo de desarrollo de la presente Tesis se presentaron los siguientes posters en congresos nacionales e internacionales:

- Herráez-Hernández, R., Estal-Rovira, E., Albert-Antón, E., **González-Fuenzalida, R. A.**, Verdú-Andrés, J., Moliner-Martínez, Y., Campins-Falcó, P. (2011). Improved Method for conditioning C18 phases prior to matrix solid-phase dispersion: application to the analysis of PAHs in biota and soil samples. 13^{as} Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona, España.
- **González-Fuenzalida, R. A.**, Verdú-Andrés, J., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P. (2012). Matrix solid-phase dispersion (MSPD) and in-valve in-tube solid phase microextraction (IT-SPME) for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. 3rd SCARCE International Conference. Valencia, España.
- Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P., Garrido-Palanca, C., **González-Fuenzalida, R. A.**, Molins-Legua, C. (2013). Study of the influence of temperature and precipitations on the levels of BTEX in natural waters. 39th International Symposium on HPLC Separations and Related Techniques. Amsterdam, Países Bajos.
- **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Prima-García, H., Ribera, A., Campins-Falcó, P., Coronado, E. (2013). Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid phase extraction and magnetic in-tube solid phase microextraction: application to organophosphorous compounds. 39th International Symposium on HPLC Separations and Related Techniques. Amsterdam, Países Bajos.
- **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P. (2013). Study of silver nanoparticles in aqueous solutions by Cap-LC, TEM and UV-Vis techniques. 4th SCARCE International Conference. Cádiz, España.
- Moliner-Martínez, Y., **González-Fuenzalida, R. A.**, Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P. (2013). Cost effective methodologies as analytical tools for testing emergent pollutants. ChemH2O Leading-Edge Conference on Sustainable Water Management. Madrid, España.
- **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P. (2014). In tube solid-phase microextraction-cap-LC as a new technique for characterization silver nanoparticles. 30th International Symposium on Chromatography. Salzburgo, Austria.
- **González-Fuenzalida, R. A.**, Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P. (2014). Study of silver nanoparticles in soils by in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography. 30th International Symposium on Chromatography. Salzburgo, Austria.
- Moliner-Martínez, Y., **González-Fuenzalida, R. A.**, Prima-García, H., Ribera, A., Coronado, E., Campins-Falcó, P. (2014). Magnetic and carbon nanoparticles based sorbent phases for in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid

chromatography. ExTech2014 16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies. Chania, Creta, Grecia.

Además, el grupo MINTOTA ha realizado 3 jornadas científicas de carácter nacional en el marco del proyecto PROMETEO:

- Campins-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., **González-Fuenzalida, R. A.**, Jornet-Martínez, N. (2012). I Jornada Científica PROMETEO 2012/045 Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ. Valencia, España.
- Campins-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., **González-Fuenzalida, R. A.**, Jornet-Martínez, N. (2013). II Jornada Científica PROMETEO 2012/045. Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ. Valencia, España.
- Campins-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., **González-Fuenzalida, R. A.**, Jornet-Martínez, N. (2014). III Jornada Científica PROMETEO 2012/045. Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ. Valencia, España.

Capítulo 3.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos

La normativa europea contempla una sección sobre la clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas [238]. La **Figura 19** muestra los diferentes pictogramas de seguridad que clasifican a una sustancia química y que se definen como símbolos de riesgo químico estandarizados por la UE con sus respectivos significados.

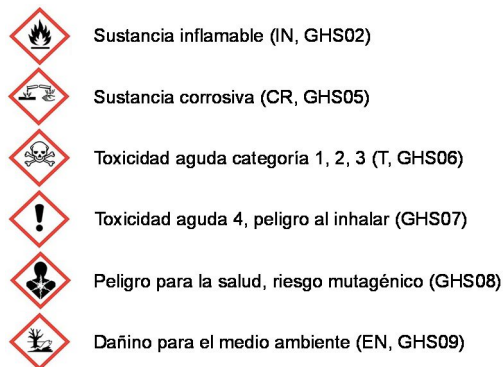


Figura 19. Pictogramas de seguridad que clasifican a las distintas sustancias químicas. Las siglas GHS denotan al sistema global y estandarizado de clasificación de sustancias.

A su vez, en la **Tabla 21** se presenta la lista de reactivos utilizados en este trabajo. Cada reactivo, de grado analítico, viene descrito por los pictogramas de seguridad correspondiente y se adjunta la casa comercial de dónde fue obtenido.

Tabla 21. Reactivos empleados en esta Tesis, con sus respectivos pictogramas de seguridad y las casas comerciales de donde se han adquirido.

Reactivo	Casa comercial						
(3-aminopropil)trietoxisilano (APTS)	Sigma-Aldrich		X		X		
1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC)	Sigma-Aldrich		X	X			
1,2-hexadecanodiol	Sigma-Aldrich						
Acetilacetato de hierro III (Fe(acac) ₃)	Sigma-Aldrich				X		
Acetato amónico (AcNH ₄)	Sigma-Aldrich						
Acetato sódico (AcNa)	Panreac						

Acetona	Teknokroma	X					
Acetonitrilo (MeCN)	Romil/Teknokroma	X		X		X	
Ácido acético (AcH)	Scharlau/Merck	X	X		X	X	
Ácido acético glacial	Merck	X	X		X	X	
Ácido Bórico	Panreac					X	
Ácido clorhídrico (37%) (HCl)	Scharlau		X	X			
Ácido nítrico (HNO ₃)	Panreac/Scharlau		X	X		X	
Ácido oleico	Sigma-Aldrich				X		
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Scharlau		X				
Atrazina	Sigma				X	X	X
AuNPs (5, 20 y 40 nm) ^a	Sigma-Aldrich						
Borohidruro sódico (NaBH ₄)	Fluka	X	X	X			
Bromuro potásico (KBr)	Sigma-Aldrich				X		
BZKC	Sigma-Aldrich		X		X		X
Cartuchos SPE de polipropileno (3 mL)	Supelco						
Cartuchos Strata SCX (55 µm)	Phenomenex						
C ₁₈ Bondesil (40 µm)	Varian/Agilent						
Citrato trisódico	Aldrich/Guinama						
Clorfenvinfos	Sigma			X			X
Cloroformo	Scharlau			X		X	
Clorpirifos	Dr. Ehrenstorfer			X			X
CTAB	Sigma-Aldrich		X		X	X	X
Diclofenaco sódico	Sigma-Aldrich						
Dimetilformamida (DMF)	Scharlau	X			X	X	
Etanol (EtOH)	Teknokroma / Romil	X					
Fenil éter	Sigma-Aldrich				X		X
Filtros de fibra de vidrio de 25 mm	Pall						
Fritas de polietileno (20 µm)	Supelco						
Florisil (malla 60-100)	Agilent				X		
Gel de sílice (malla 70-230)	Agilent						
Glicerol	Aldrich/Sigma-Aldrich						
Glutaraldehído	Sigma-Aldrich		X		X	X	X
Hidróxido sódico (NaOH)	Mallinckrodt Baker		X		X		
Irgacure-2959 (I-2959)	Aldrich						
Isopropanol	Carlo Erba	X			X		
Metanol (MeOH)	Teknokroma / Scharlau	X		X			
MWCNTs	Sigma-Aldrich				X		
n-hexano	Carlo Erba/Scharlau	X			X	X	X

Nitrato de plata (AgNO_3)	Scharlau/Sigma-Aldrich		X		X		X
Oleilamina	Sigma-Aldrich		X				X
PAHs (mezcla de 16) ^b	Supelco	X			X	X	X
PAHs (individuales)	Sigma-Aldrich	X			X	X	X
PAHs (derivados, individuales)	Sigma-Aldrich				X	X	
PAHs (deuterados) ^c	Sigma-Aldrich	X			X	X	X
Peróxido de hidrógeno (30%) (H_2O_2)	Panreac		X		X		
Polietilenglicol (PEG)	Sigma-Aldrich						
SDS	Merck			X	X		
Simazina	Sigma					X	X
SWCNTs	Sigma-Aldrich				X		
Sylgard 184 base de elastómero de silicona	Sigma-Aldrich				X		
Sylgard 184 agente de curado	Sigma-Aldrich				X		
TBA	Sigma				X		
TEOS (tetraetilortosilicato)	Sigma-Aldrich	X			X		
Tetrahidrofurano estabilizado ^d	Scharlau	X			X	X	
Tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Merck				X		
TMB	Aldrich						
Urea	Prolabo						

^a0.1 mM en tampón fosfato salino (PBS)

^b10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada uno en MeCN, 15 PAHs estudiados más acenafileno

^cNaf-d8, Fen-d10, Pir-d10, Cri-d12

^d250 ppm de 2,6-di-ter-butil-4-metilfenol (BHT, butilhidroxitolueno) adicionados

3.2 Instrumentación

En los diferentes procedimientos experimentales, se utilizaron los siguientes instrumentos:

- Baño de ultrasonidos Sonitech (TerraTech)
- Centrífuga EBA 200 (Hettich)
- Membranas de nylon de 0.45 μm para filtración (Teknokroma)
- pH metro Crison micropH 2000 (Crison Instruments)
- Sistema de purificación de agua Nanopure II (Barnstead)
- Tamizador electromagnético y digital BA 200N (Cisa)

A lo largo de la Tesis, se utilizaron diversas técnicas de medida que pueden agruparse en tres grupos: espectroscópicas, microscópicas y cromatográficas (las técnicas de

extracción se discutirán por separado). El detalle de los equipos involucrados se presenta a continuación.

3.2.1 Técnicas espectroscópicas

3.2.1.1 Espectrofotometría UV-Vis

Los espectros se registraron con un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 60 equipado con fibra óptica (ver **Figura 20**). La fibra óptica era introducida directamente en el vial que contuviera la muestra o patrón y la señal analítica se registraba entre 200 y 1000 nm.



Figura 20. Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 equipado con una fibra óptica.

3.2.1.2 Espectroscopía de Absorción Atómica con Cámara de Grafito (GFAAS)

Se empleó un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer 4100 ZL (Zeeman) equipado con una cámara de grafito (ver **Figura 21**) para determinar la cantidad de analito en una muestra. La longitud de onda se fijó a 328.1 nm en el caso de la plata.



Figura 21. Espectrómetro Perkin Elmer 4100 ZL (Zeeman) equipado con una cámara de grafito.

3.2.1.3 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

Los correlogramas (representaciones de la variación del coeficiente de correlación con el tiempo, explicada con más detalle en la sección posterior correspondiente) se obtuvieron con un sistema Zetasizer Nano ZS (ver **Figura 22**). Este equipo permite estimar las dispersiones de tamaño de partículas de entre 0.6-3000 nm. Las muestras fueron puestas en cubetas y directamente medidas.



Figura 22. Sistema Zetasizer Nano ZS para realizar el análisis por DLS.

3.2.1.4 Espectroscopía Infrarroja (IR)

Se empleó el espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 60 equipado de un accesorio FTIR Cary 630 (ver **Figura 23**) que permite medir espectros en el rango de $4000-600\text{ cm}^{-1}$ (IR medio, MIR).



Figura 23. Accesorio FTIR 630 que permite la obtención de espectros en el MIR.

Dicho accesorio funciona bajo el principio de reflectancia total atenuada (ATR), pudiendo analizar directamente una muestra (sólida en este caso) en contacto con el cristal del equipo (por donde se hace pasar la radiación IR). Para el análisis de datos se utilizó el software MicroLab FTIR (Agilent Technologies).

3.2.2 Técnicas microscópicas

3.2.2.1 Microscopía óptica

Para realizar fotografías de las muestras sólidas (suelos y sedimentos) se utilizó un microscopio ECLIPSE E200 (Nikon), bajo iluminación de campo claro. El microscopio en cuestión (mostrado en la **Figura 24**) posee tres lentes del objetivo (10x, 50x, 100x). Para procesar las imágenes y los datos correspondientes, se empleó el software Nis-Elements (versión 4.20.02, Nikon) que permite obtener, por ejemplo, distribuciones de tamaños (histogramas) de las partículas analizadas.



Figura 24. Microscopio óptico Nikon.

3.2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (Jeol), operando a 100 kV. Para la preparación de muestras de TEM, una gota (aproximadamente 10 μ L) de la sustancia a analizar (e.g. NPs) fue depositada sobre una rejilla para TEM (i.e. una rejilla de cobre recubierta de carbono-formvar y 300 de malla, Aname), la cual se dejó secar durante un día a temperatura ambiente. Los tamaños de las partículas analizadas fueron calculados utilizando el software ImageJ y las distribuciones de los mismos con el software Histogram. En caso de necesitar mayor resolución, también se empleó un microscopio electrónico de

alta resolución (HRTEM) Philips Tecnai F20 que opera a 200 kV. En la **Figura 25** se pueden observar ambos microscopios utilizados.

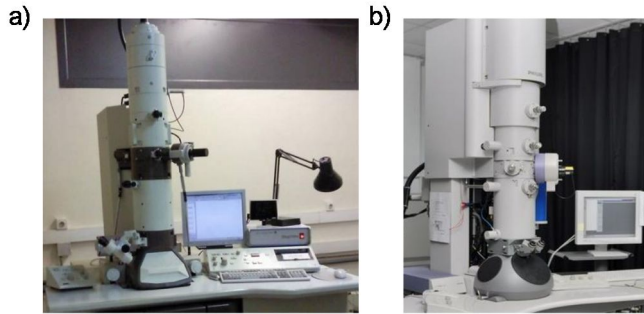


Figura 25. Microscopios electrónicos de transmisión: a) JEM-1010 (Jeol) y b) Philips Tecnai F20.

3.2.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la presente Tesis, se hizo uso de dos microscopios electrónicos de barrido: por un lado, un equipo Hitachi S-4100 operando a 10 kV para analizar las superficies de los capilares requeridos para la IT-SPME; por otro lado, un microscopio Philips XL 30 ESEM que incorpora un sistema EDAX para realizar microanálisis (obtener la composición por elemento de un compuesto) en muestras de suelo (fortificadas con plata en este estudio). En los dos casos, dichas muestras tuvieron que ser recubiertas por oro y paladio (recubrimiento Au/Pd), para la conducción de los electrones. La **Figura 26** muestra ambos equipos.

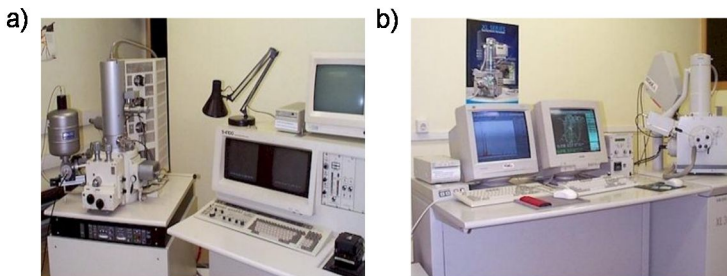


Figura 26. Microscopios electrónicos de barrido: a) Hitachi S-4100 y b) Philips XL 30 ESEM.

3.2.3 Técnicas cromatográficas

Se trabajó con sistemas de LC de las 3 dimensiones posibles: HPLC convencional, Cap-LC y nano-LC. El detector fue de fluorescencia (FLD) en el primer caso; en los otros dos, de fila de diodos (DAD). Dichos sistemas se acoplaron a IT-SPME en diferentes configuraciones (lo que será tratado posteriormente). También, se emplearon equipos de GC con diferentes espectrómetros de masas. Las condiciones experimentales específicas se detallarán posteriormente.

3.2.3.1 HPLC-FLD

Esta técnica se utilizó en 2 métodos para analizar PAHs en sedimentos (en la optimización de un primero basado en la MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD y en el desarrollo de un segundo que hace uso de la UAE-IT-SPME-HPLC-FLD). Para ambos casos, el sistema cromatográfico consiste en una bomba cuaternaria (Hewlett-Packard, Serie 1050), una válvula de inyección de alta presión de 6 puertos (modelo Rheodyne 7000) y un detector fluorimétrico programable (Hewlett-Packard, Series 1046 y 1100 para el primer y segundo método respectivamente). El FLD utilizado (ambos modelos) permite el registro simultáneo de hasta cuatro longitudes de onda de emisión (λ_{emis}) diferentes a una onda de excitación (λ_{exc}) fija en un intervalo de tiempo. En el segundo método, el sistema posee un compartimento termostatzado para la columna analítica (Hewlett-Packard, Serie 1100). En ambos métodos, el detector estaba conectado a un sistema de adquisición y tratamiento de datos (Hewlett-Packard, HPLC ChemStation). El equipo del segundo método se muestra en la **Figura 27**.



Figura 27. Sistema HPLC-FLD con compartimento termostatzado para la columna analítica.

3.2.3.2 Cap-LC-DAD

Dependiendo del analito en cuestión, se utilizaron diferentes equipos. Para los estudios tanto del diclofenaco como de los pesticidas (OPs y triazinas), el sistema consiste en un cromatógrafo líquido capilar con una bomba capilar isocrática (Jasco), una válvula de inyección convencional de 6-puertos (Rheodyne 7725), un detector DAD (Agilent, Serie 1200) y una celda de flujo de 80 nL. La señal analítica se registró entre 190-400. La válvula del sistema se puede intercambiar por una válvula de inyección de 6-puertos con volumen interno de 2 μL (Rheodyne 7410) cuando fuese necesario.

Para el análisis de NPs (AgNPs y AuNPs), se empleó un cromatógrafo líquido convencional (HPLC) que posee un divisor de flujos que permite realizar Cap-LC. El sistema consiste en una bomba capilar binaria de gradiente y DAD (Agilent, Series 1200), así como de una válvula de inyección de 6-puertos con volumen interno de 2 μL (Rheodyne 7410) para estudios de Cap-LC-DAD y una válvula de inyección convencional de 6-puertos para los correspondientes a IT-SPME-Cap-LC (Rheodyne 7725). La señal se registró entre 190-800 nm. En la **Figura 28** se puede ver el equipo en cuestión.

En ambos sistemas, el detector estaba conectado a un sistema de adquisición y tratamiento de datos (Agilent, HPLC ChemStation).



Figura 28. Sistema para realizar Cap-LC-DAD.

3.2.3.3 Nano-LC-DAD

El sistema nanocromatográfico (utilizado en la determinación de diclofenaco) está provisto de una nanobomba (Agilent, Serie Infinity 1260) y DAD (Agilent, Serie 1200) equipado con una celda de flujo de 80 nL. Dicho sistema posee dos válvulas de inyección interconectadas: una válvula de inyección convencional de 6 puertos (Rheodyne 7725) provista de un loop PEEK (poliéter éter cetona, de i.d. 0.127 mm) conectada a su vez a una válvula micro-automática (“micro switching valve”, Agilent). El sistema es completado por una bomba capilar isocrática (Jasco). La señal analítica fue registrada entre 190 y 400 nm. Por otra parte, el detector estaba conectado a un sistema de adquisición y tratamiento de datos (Agilent, HPLC ChemStation). El equipo se muestra en la **Figura 29** (nota: este equipo ensamblado de otra manera es el que se utilizó para analizar diclofenaco y pesticidas por Cap-LC-DAD).



Figura 29. Sistema para realizar nano-LC-DAD.

3.2.3.4 GC acoplada a MS

Se utilizaron 3 equipos de cromatografía de gases, todos utilizando helio como gas transportador. El sistema GC-MS/MS consiste en un cromatógrafo de gases Varian (Serie CP-3800) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Varian (Serie 1200L) con automuestreador (Varian) e inyección split/splitless. Se trabajó en la modalidad de ionización EI, aunque el equipo puede funcionar utilizando CI con metano como gas reactivo (ambos métodos serán explicados más adelante). Este equipo posee 3 cuadrupolos: el primero y el tercero actúan como filtros (i.e. se puede seleccionar una masa determinada), mientras que el segundo lo hace como celda de colisión (donde se fragmentan los iones). Se

trabajó en dos modos de adquisición: full scan (en donde se fragmenta la molécula y se analizan todos los iones en un rango determinado) y en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) o simple (SRM, para cuantificación). En el MRM, el primer cuadrupolo filtra un ion, el segundo lo fragmenta y luego estos iones hijos se filtran en el tercero. Con el MRM también se pueden optimizar las energías de colisión. El equipo cuenta con un sistema de adquisición y procesamiento de datos (Varian MS Workstation). En la **Figura 30** se muestra el sistema GC-MS/MS utilizado en esta Tesis con el objetivo de analizar los derivados de PAHs.

El sistema empleado tanto en el análisis de PAHs como de sus derivados consiste en un cromatógrafo de gases Thermo Quest (Serie Trace GC 2000), con un inyector split/splitless y automuestreador (Thermo Finnigan), acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Finnigan (Serie Trace MS) de cuadrupolo simple. Se trabajó en modalidad EI con modo de adquisición full scan o monitorización selectiva de iones (SIM, análogo al SRM en GC-MS/MS).

Para el análisis por CI de los derivados de PAHs se hizo uso de un cromatógrafo de gases Thermo Scientific (Serie Trace GC 1300), con un inyector split/splitless y automuestreador (Varian), acoplado a un espectrómetro de masas Varian (ITQ 900) de trampa iónica. No se realizó MS^n , es decir, se trabajó como si se tratase de un equipo de simple cuadrupolo tanto en full scan como en SIM. No obstante, el sistema permitía cambiar la polaridad de ionización en un mismo análisis.

Los dos equipos que se emplearon para GC-MS cuentan con el mismo software para tratar los datos (Xcalibur).

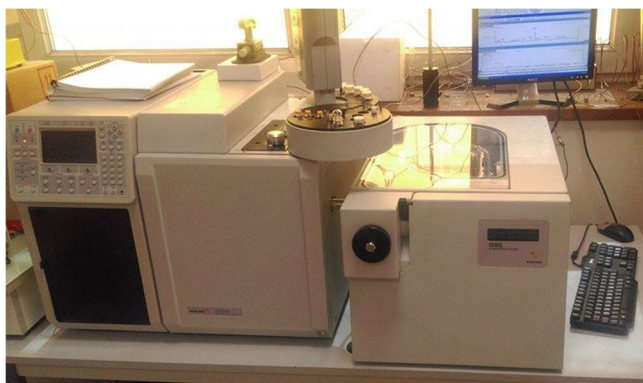


Figura 30. Sistema GC-MS/MS que consiste en un cromatógrafo de gases (a la izquierda) y el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (a la derecha).

3.3 Técnicas de extracción

En el marco de la presente Tesis, diversas técnicas de extracción han sido utilizadas, que pueden ser separadas en procedimientos fuera de línea (i.e. etapa de pretratamiento de muestra) y en línea (i.e. acoplado al sistema de separación/detección, en esta Tesis, HPLC-FLD o LC-DAD). Todas ellas buscan separar a los analitos de los componentes de la matriz en que se encuentran como también preconcentrarlos. En el caso de realizarse una optimización de dichos procedimientos, ésta se detallará en la sección de resultados del método correspondiente.

3.3.1 Procedimientos de extracción fuera de línea

3.3.1.1 MSPE

Es una técnica de extracción que involucra añadir un material adsorbente (en este caso, nanomaterial) con propiedades magnéticas a la muestra (aguas) y utilizando un imán los analitos adsorbidos en dicho material pueden ser separados de la matriz acuosa. Se siguió el procedimiento descrito en un trabajo previo de MINTOTA [82] y se adaptó para la extracción y posterior cuantificación de OPs en aguas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: 50 mg de adsorbente magnético (nanomaterial desarrollado por MINTOTA-RTMM cuya síntesis se explica en la sección 3.4) se añadieron a 20 mL de muestra o patrón. Se agitó durante 60 min. Pasado este tiempo, el material adsorbente fue aislado con la ayuda de un imán de neodimio (Nd) en forma de disco y el sobrenadante desechado (un esquema representativo del procedimiento es presentado en la **Figura 31**).

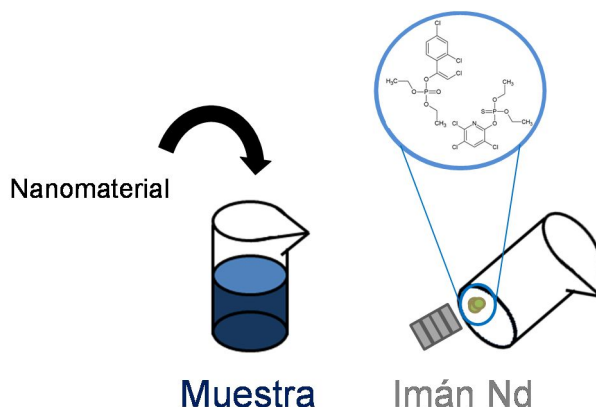


Figura 31. Esquema representativo de la extracción en fase sólida magnética (MSPE). Los analitos (OPs) se retienen con la ayuda de un imán de Nd para ser redisoluertos en el disolvente adecuado.

El adsorbente fue secado por corriente de aire y suspendido en 500 μL de MeOH, el cual extrae los analitos orgánicos (i.e OPs). Con el mismo imán, se separó el material adsorbente. Finalmente, el extracto metanólico se diluye con un 1 mL de agua, quedando la muestra en condiciones de ser inyectada y medida en el sistema cromatográfico.

3.3.1.2 MSPD

Esta técnica se empleó para el análisis de PAHs en sedimentos marinos. El procedimiento fue adaptado del utilizado por MINTOTA para la determinación de PAHs en biota [73]. En la **Figura 32** se muestra un esquema de los pasos a seguir.

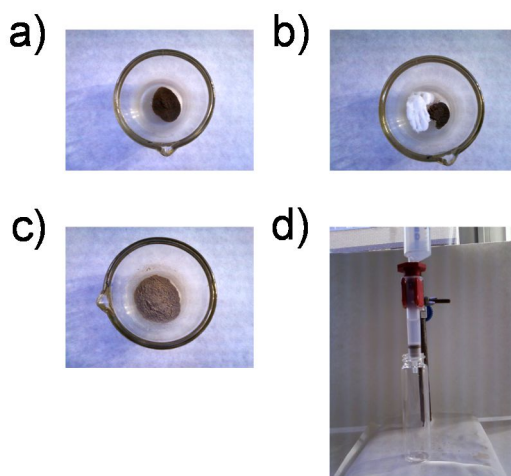


Figura 32. Esquema por pasos del procedimiento MSPD para el análisis de una muestra de sedimentos: a) muestra en el mortero, b) muestra y fase C₁₈ en el mortero antes de mezclar, c) muestra y fase C₁₈ mezcladas en el mortero, d) muestra y fase C₁₈ mezcladas puestas en un cartucho de extracción (SPE).

El procedimiento es el siguiente: se pesan 100 mg de muestra (sedimento marino) y se ponen en un mortero (**Figura 32 a**). Se pesan 400 mg de fase extractiva C₁₈ y se añaden en el mortero junto con la muestra (**Figura 32 b**). Luego se tritura durante 5 min obteniéndose una mezcla (**Figura 32 c**). Dicha muestra se introduce en el fondo de un cartucho SPE de polipropileno (de 3 mL) y se introduce una frita de polietileno en la parte superior (**Figura 32 d**). Para desorber los analitos, se hace pasar 1.2 mL de MeCN aplicando presión positiva (i.e. aire con la ayuda de una jeringa) y los extractos se recogen en viales. Finalmente se añaden 2.6 mL de agua, obteniéndose el extracto final, el cual puede ser inyectado al

cromatógrafo. Para estudios de la presencia de interferentes en la fase C₁₈, los 100 mg de muestra no son añadidos. En esta Tesis, se hizo un estudio completo de los contaminantes de esta fase extractiva para así mejorar la metodología de análisis de PAHs en sedimentos mediante la aplicación de un protocolo de lavado previo al procedimiento.

3.3.1.3 UAE

Aplicado a la extracción de PAHs en sedimentos, este método ha sido optimizado en el presente trabajo. En él, 0.3 g de una muestra de sedimentos se introducen en un vial de vidrio oscuro (de 10 mL), mezclado con una cantidad de disolvente orgánico de extracción (uno o varios). El vial (o los viales, en caso de hacer más extracciones) se ubica en un baño de ultrasonidos (300 W, 40 kHz) y se aplica sonicación por un periodo de tiempo definido. Un sistema de circulación de agua (Select) se utiliza para mantener la temperatura constante alrededor de los viales (la temperatura se puede fijar en un valor determinado, lo que constituye otra variable del procedimiento). Luego, el vial (o los viales) se centrifuga a 6000 rpm durante 5 min. A continuación, se toma una cantidad del sobrenadante, la cual se introduce en un vial de vidrio y se mezcla con 3.6 mL de agua [73], obteniéndose el extracto final que puede ser inyectado y medido por cromatografía. Los parámetros siguientes han sido optimizados y se discutirán en el capítulo correspondiente: cantidad y naturaleza del disolvente orgánico de extracción, tiempo de sonicación, temperatura del sistema y cantidad del sobrenadante.

3.3.1.4 PLE (ASE)

La PLE fue utilizada para el análisis de PAHs en aire previo a la GC. Se utilizaron muestreadores pasivos de aire (partículas en suspensión) en los que se ubicaron filtros de fibra de vidrio de 25 mm (Pall). Para estudios de recuperación, éstos se fortificaron con una cantidad conocida de patrón. En la PLE, dichos filtros se cortan y se mezclan con arena (Fontainebleu), ubicándose en celdas de acero inoxidable de un equipo para ASE (Dionex ASE 300). La arena reduce el volumen muerto de la celda. Se utilizó un método optimizado por el grupo de investigación ICPEES de la Universidad de Estrasburgo con disolvente MeCN al 100% a alta temperatura (entre 100-150°C) y presión aproximadamente de 100 bar. Los extractos obtenidos en MeCN se llevan al rotavapor (Labotech) hasta obtención de un volumen menor a 1 mL (40°C y 200 mbar). Se afora a 1 mL con MeCN. Así, los extractos finales son obtenidos y puede procederse al análisis por GC.

3.3.2 Procedimientos de extracción en línea

Las condiciones experimentales específicas para los siguientes procedimientos serán detalladas en la sección 3.5.

3.3.2.1 IT-SPME en válvula (acoplado a HPLC o Cap-LC)

Esta técnica fue ampliamente discutida en la sección 1.4. Para lograr la IT-SPME, el bucle de inyección de acero inoxidable de una válvula de inyección convencional (en este caso, Rheodyne 7725) es reemplazado por una columna capilar de GC de naturaleza y funcionalización diversa (dependiendo del analito). Para la correcta conexión capilar-válvula, se utilizaron conexiones PEEK. Para procesar las muestras, se empleó una jeringa de precisión de 1 mL o de 500 μL (a velocidad de inyección de 10 $\mu\text{L/s}$). Un volumen determinado de muestra o patrón se procesa en la posición de “carga” de la válvula y a continuación, se gira la válvula a posición de “inyección”, con lo que la fase móvil pasa a través del capilar desorbiendo los analitos. La **Figura 33** muestra las respectivas posiciones de trabajo de una válvula de inyección de 6 puertos.

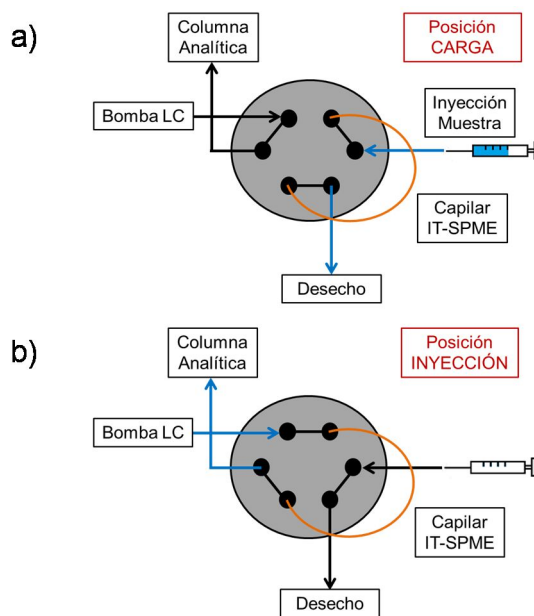
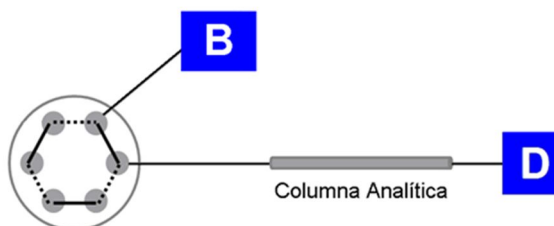


Figura 33. Sistema de inyección para LC con válvula de 6 puertos convencional. a) Posición de “carga”. b) Posición de “inyección”.

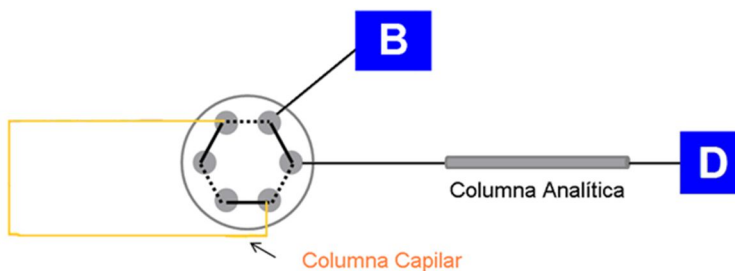
La IT-SPME permite la limpieza de la muestra y la extracción y preconcentración de los analitos. En esta técnica, un factor crítico es la eficiencia de extracción de las sustancias analizadas. Para el cálculo de este parámetro, se cambió la válvula del sistema por una de

volumen fijo de 2 μL (Rheodyne 7410) y con el método resultante (HPLC-DAD o Cap-LC), se procesaron los patrones necesarios para obtener el valor de la eficiencia de extracción o de recuperación absoluta (este punto será retomado en las secciones que involucren su cálculo). En la **Figuras 34**, se representan las configuraciones de LC (HPLC o Cap-LC) e IT-SPME-LC acopladas a FLD o DAD utilizadas en esta Tesis.

a) HPLC-FLD / Cap-LC-DAD



b) IT-SPME-HPLC-FLD / IT-SPME-Cap-LC-DAD



B: Bomba o Bomba Cap D: Detector (FLD o DAD)

Figura 34. Representación de los sistemas de LC acoplados a detección espectrofotométrica utilizados: a) HPLC-FLD o Cap-LC-DAD con válvula de inyección de volumen fijo. b) IT-SPME-HPLC-FLD o IT-SPME-Cap-LC-DAD con columna capilar de naturaleza variable.

Es preciso recalcar que la diferencia entre el empleo de HPLC o Cap-LC en cuanto a montaje radica en las dimensiones de los diámetros internos de columnas analíticas y capilares, así como en los valores de flujos de la bomba y la bomba capilar. Los parámetros

en cuestión para la Cap-LC se pueden ver en la **Tabla 2** de la sección 1.4.2; en tanto para HPLC, los valores de los mismos suelen ser iguales o superiores al valor máximo utilizado en Cap-LC (i.e. 0.32 mm para el i.d. de la columna capilar, del orden del mm y mL/min para el i.d. de la columna analítica y el flujo de la bomba del sistema respectivamente).

3.3.2.2 IT-SPME magnética en válvula (acoplado a Cap-LC)

Si la columna capilar utilizada para la IT-SPME es funcionalizada con un material (o nanomaterial) adsorbente con propiedades magnéticas (en este caso el nanomaterial desarrollado por MINTOTA-RTMM), se pueden incrementar las eficiencias de extracción de compuestos orgánicos diamagnéticos [71]. El nanomaterial híbrido de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ posee NPs superparamagnéticas que responden a campos magnéticos externos aplicados al sistema. La explicación del fenómeno del superparamagnetismo así como los procesos de adsorción-desorción de los analitos en el nanomaterial bajo las condiciones de trabajo serán explicados en el capítulo dedicado a la IT-SPME magnética para la determinación de OPs y triazinas.

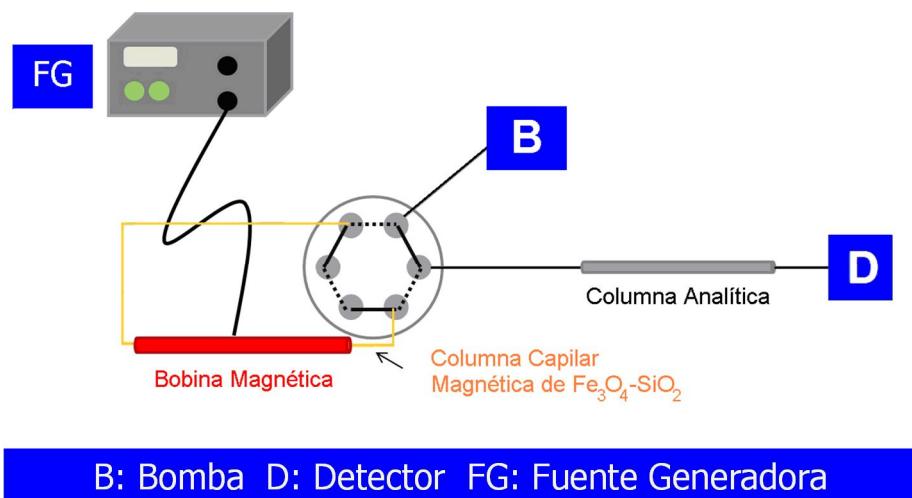


Figura 35. Representación del sistema empleado para la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

El montaje para esta técnica es similar al de la IT-SPME-Cap-LC-DAD (mostrado en la **Figura 34 b**) pero con la diferencia que la columna capilar (funcionalizada con el nanomaterial magnético) permanece en el interior de una bobina magnética, que se conecta

a una fuente generadora (ver **Figura 35**). Dicha fuente permite aplicar campos magnéticos con polaridad determinada (el sistema permite realizar cambios de polaridad). Por lo tanto, la intensidad y la polaridad del campo magnético pasan a ser dos parámetros ajustables y optimizables del sistema empleado.

3.3.2.3 IT-SPME en válvula (acoplado a nano-LC)

El acoplamiento de la IT-SPME a nanocromatografía líquida se llevó a cabo utilizando dos válvulas de inyección conectadas. El sistema empleado se puede ver en la **Figura 36**.

Sistema nanocromatográfico

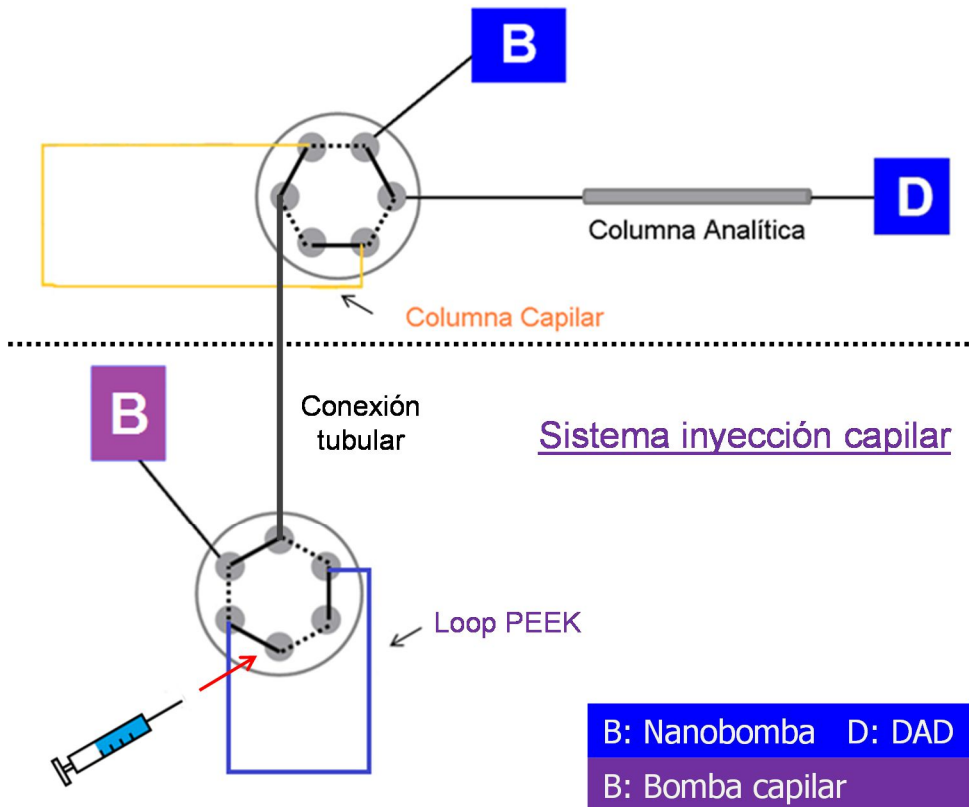


Figura 36. Representación esquemática de la IT-SPME-nano-LC-DAD que acopla un sistema de inyección capilar con otro nanocromatográfico.

Este sistema de inyección consiste en una bomba capilar isocrática unida a una válvula de inyección convencional provista de un loop PEEK. Esta válvula (válvula 1) se conecta a una válvula micro-automática o de conmutación automática (válvula 2) por medio de una conexión tubular que termina en la columna capilar (i.e. la válvula 2 está acoplada al capilar). Al mismo tiempo, la válvula 2 se encuentra unida a una nanobomba. En otras palabras, la IT-SPME-nano-LC implica un sistema de inyección capilar y luego, una separación nanocromatográfica. Aunque se hayan propuesto sistemas de doble válvula para el acoplamiento IT-SPME y LC, el sistema puntual propuesto en esta Tesis no se había realizado anteriormente.

En este procedimiento, es crucial la etapa de inyección de la muestra en el sistema. La **Figura 37** muestra el esquema de la etapa para las válvulas 1 y 2.

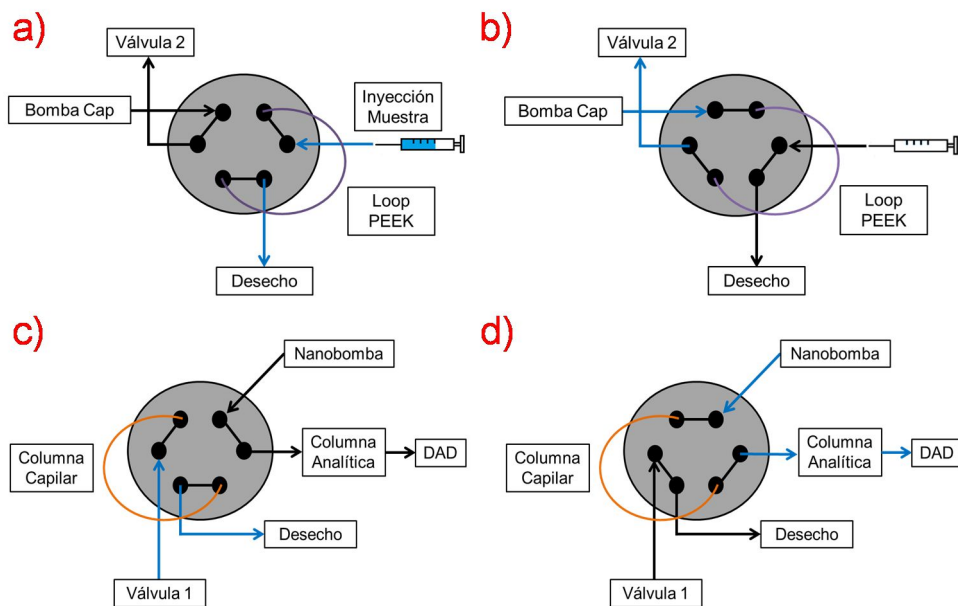


Figura 37. Esquema de la etapa de inyección en el sistema de IT-SPME-nano-LC-DAD: a) válvula 1 en posición de “carga”, b) válvula 1 en posición de “inyección”, c) válvula 2 en posición de “carga”, d) válvula 2 en posición de “inyección”.

El bucle PEEK se llena con una muestra o patrón utilizando una jeringa de precisión de 500 μL cuando la válvula 1 está en posición de “carga” (**Figura 37 a**). Luego, la válvula 1

se cambia a posición de “inyección” (**Figura 37 b**), la disolución a medir se transfiere del bucle de inyección a la columna capilar (que es el loop de carga del sistema) impulsada por la bomba capilar en un cierto tiempo de transferencia (parámetro que debe ser optimizado). Después de este tiempo, la bomba capilar es apagada. Luego, la válvula 2, que durante toda la etapa ha estado en posición de “carga” (**Figura 37 c**), se cambia a posición de “inyección” (**Figura 37 d**) y con ello la disolución es transferida a la columna analítica desde la columna capilar. Los flujos y las dimensiones de las columnas en cuestión respetan los valores presentados en la **Tabla 2** de la sección 1.4.2. de la Introducción.

3.4 Síntesis de nanomateriales adsorbentes, capilares y AgNPs

En esta Tesis se han utilizado diferentes procedimientos para sintetizar, por una parte, materiales (adsorbentes y capilares) que se utilizan en el desarrollo de los métodos para estudiar los analitos diana y por otra, las mismas sustancias a analizar (e.g. las AgNPs).

Se ha mencionado previamente que para la IT-SPME Magnética-Cap-LC-DAD (en su versión no magnética también) y la IT-SPME-nano-LC-DAD se ha hecho uso de un nanomaterial adsorbente magnético desarrollado por MINTOTA-RTMM, al mismo tiempo que se han sintetizado otras fases extractivas como rellenos de capilares de extracción (utilizadas principalmente en el método nanocromatográfico). En cuanto a las AgNPs, se han preparado síntesis de distinta naturaleza: fotoquímicas, térmicas (con diferentes agentes reductores) y clásicas (métodos de Frank [239] y Mirkin [240]).

3.4.1 Síntesis de las NPs de Fe_3O_4 , del nanomaterial de Fe_3O_4 y del capilar magnético.

Para preparar los capilares magnéticos se siguió un procedimiento patentado por MINTOTA y RTMM, que se puede dividir en tres etapas esquemáticamente. Las NPs de Fe_3O_4 (NPs magnéticas, MNPs) se sintetizaron siguiendo el método propuesto por Sun y Zeng [241].

a) Síntesis de las NPs de Fe_3O_4 esféricas y coloides Fe_3O_4 -CTAB solubles en agua

Se mezclaron 0.706 g de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 2.013 g de 1,2-hexadecanodiol, 1.695 g de ácido oleico y 1.605 g de oleilamina en 20 mL de fenil éter bajo corriente de argón (20 min) para asegurar una atmósfera inerte. Luego, esta mezcla se puso a reflujo durante 30 min a una temperatura de 263°C. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez fría, se añadieron 80 mL de etanol. La mezcla resultante se centrifugó 10 min a 10000 rpm para separar el material marrón oscuro. Dicho material se redisolvió en 20 mL de hexano. Así, NPs esféricas de un diámetro promedio de 5 nm fueron obtenidas (NPs de Fe_3O_4 rodeadas de oleato).

Los 20 mL obtenidos de la etapa previa (NPs de Fe_3O_4 -oleato en hexano) fueron mezclados con 20 mL de una disolución de CTAB 0.1 M, obteniéndose coloides de Fe_3O_4 -CTAB solubles en agua. El hexano se eliminó utilizando el rotavapor.

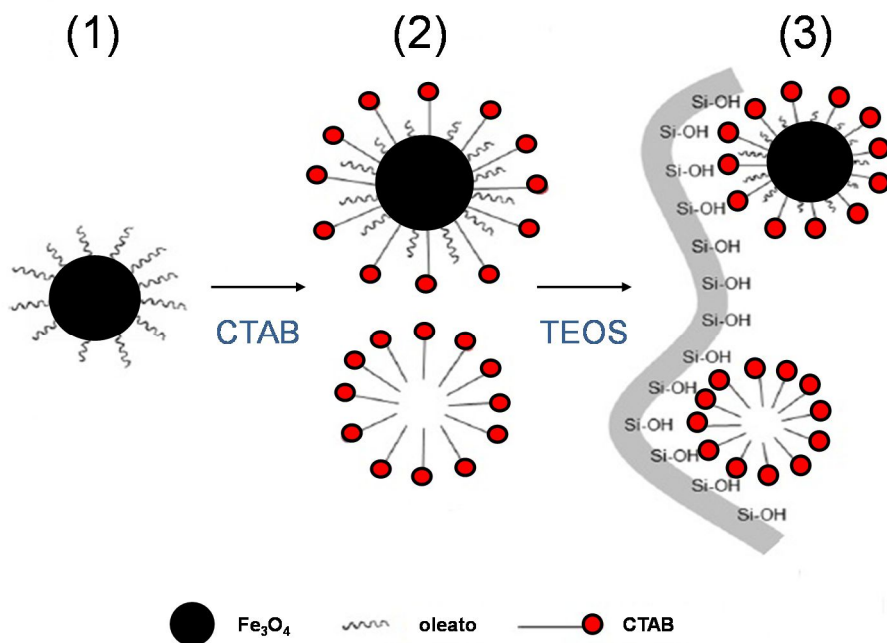


Figura 38. Esquema de la formación del nanomaterial adsorbente magnético. (1) NPs Fe_3O_4 -oleato. (2) (arriba) Estructuras micelares de NPs de Fe_3O_4 -CTAB-oleato. (abajo) Micelas de CTAB. (3) Nanomaterial adsorbente de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2 /PEG.

b) Síntesis del nanomaterial de Fe_3O_4 - SiO_2

Se preparó una disolución que consistió en 0.9 g de PEG, 0.9 g de urea y 10 mL de ácido acético 10 mM. Un volumen de 2.5 mL de esta disolución se mezcló con 1 mL de la dispersión acuosa de Fe_3O_4 -CTAB preparada anteriormente y el pH se ajustó con NaOH 1 M (7 mL) hasta un valor de 11. Luego, se añadió 1 mL de TEOS y se agitó hasta obtener un gel homogéneo, evidencia de la formación de una matriz de sílice con incrustaciones de estructuras micelares de NPs de Fe_3O_4 -CTAB (y oleato). En la **Figura 38** se esquematiza la formación del nanomaterial adsorbente sintetizado.

c) Síntesis del capilar magnético

El gel obtenido en el apartado anterior se inyectó a una columna capilar de sílice (SiO_2) fundida (i.d. de 75 o 100 μm , Análisis Vínicos), la cual había sido previamente tratada con NaOH 1 M. Los extremos del capilar se sellaron y éste se introdujo en el horno en donde se utilizó el programa de temperaturas descrito en [71], variación de un procedimiento optimizado por Hara y colaboradores [242]: 20 h a 43°C , luego la temperatura se aumentó a $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 120°C y se mantuvo constante durante 2 h, seguido de lavados de agua y MeOH ; finalmente, luego de secarse, el capilar se calentó a 330°C durante 25 h. Así, se obtiene el capilar basado en NPs esféricas de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG (anteriormente llamado, por simplificar, como capilar magnético de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$).

Adicionalmente, se varió el procedimiento realizando solamente las etapas b y c, esta vez añadiendo una dispersión acuosa de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CTAB}$ con NPs en forma de bastón (suministradas por el grupo RTMN) y, por otro lado, sin añadir dispersión con lo que se obtuvieron un capilar basado en NPs en forma de bastón de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG y otro capilar con material adsorbente de $\text{SiO}_2\text{-PEG}$ respectivamente.

La **Figura 39** muestra las etapas b y c del procedimiento para MNPs en general (esféricas o bastones) hasta la obtención de los capilares magnéticos. Es importante señalar que estos capilares se utilizaron en estudios en donde no se empleó la Magnetic-IT-SPME, es decir que se aprovecharon sus propiedades netamente adsorbentes (en la IT-SPME acoplada a LC miniaturizada).

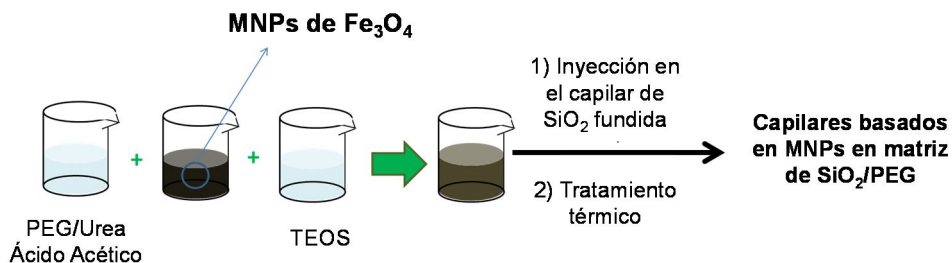


Figura 39. Etapas de la síntesis para la obtención del nanomaterial adsorbente magnético y finalmente, los capilares basados en MNPs en matriz de SiO_2/PEG .

3.4.2 Síntesis de otras columnas capilares para IT-SPME

Se emplearon, después de la funcionalización adecuada, capilares comerciales de SiO₂ fundida de i.d. 75 y 100 μm (como los utilizados para la síntesis de capilares magnéticos en la sección anterior), así como capilares de PDMS TRB-5 y PDMS TRB-35 (Teknokroma) con i.d. de 100 μm y espesor de fase 0.1 μm. Adicionalmente, los capilares de PDMS (dependiendo del caso, algunos con i.d. de 0.32 μm) se utilizaron directamente.

Esta vez, se seleccionó como nanomaterial a los CNTs (SWCNTs y MWCNTs), los cuales deben ser funcionalizados para ser empleados en la síntesis de un capilar. Para lograr dicha funcionalización, los CNTs fueron carboxilados en c-SWCNTs y c-MWCNTs siguiendo variaciones de los procedimientos de Suárez [243] y Sombra [244] respectivamente.

a) Funcionalización de CNTs

Los c-SWCNTs fueron preparados añadiendo SWCNTs (25 mg) a una mezcla 3:1 (v/v) de H₂SO₄:HNO₃ (5 mL). La dispersión resultante se sometió a sonicación durante 90 min y, después de ser diluida con agua (500 mL), se filtró a través de membranas de nylon de 0.45 μm. Finalmente, el residuo obtenido fue filtrado con agua acidificada (usando HCl 1 M) y los c-SWCNTs se dejaron secar a temperatura ambiente. Para los c-MWCNTs, el procedimiento fue prácticamente el mismo, a excepción de las cantidades iniciales de MWCNTs (20 mg) y mezcla H₂SO₄:HNO₃ (80 mL).

b) Columnas capilares basadas en CNTs (c-SWCNTs) en matriz de SiO₂/PEG

Siguiendo un procedimiento de la bibliografía [244], la superficie interna de una columna capilar de SiO₂/PEG (cuya síntesis fue descrita en el apartado anterior) fue activada pasando NaOH 1 M y agua durante 10 y 2 min respectivamente. A continuación, el capilar fue tratado con una disolución 2% (v/v) de APTS preparada en acetona. El exceso de APTS fue eliminado por lavados sucesivos de 2 min con agua y MeOH. Más tarde, el capilar fue tratado con tampón borato (pH = 9, preparado a partir de ácido bórico y NaOH) con 10% (v/v) de glutaraldehído (es el agente del cross-linking). Finalmente, 5 mg/mL de c-SWCNTs preparados en DMF (4.5 mL) conteniendo DCC (0.5 mg) se hicieron pasar por el capilar durante 10 min y se dejó reposar 1 h para asegurar la unión de los CNTs. Para eliminar los c-SWCNTs libres, el capilar se lavó con agua.

c) Columnas capilares basadas en CNTs (c-SWCNTs y c-MWCNTs) en PDMS TRB-5

La superficie interna de un capilar comercial de PDMS TRB-5 (i.d. de 100 μm) debe ser activada para lograr la funcionalización de las columnas con CNTs. Esta activación se realizó en dos pasos: etapa de oxidación y la funcionalización en sí. Primero, y siguiendo el

procedimiento de Slentz [245], se hizo pasar NaOH 5 M por el capilar durante 10 min, esperando 24 h para conseguir una oxidación completa.

Para la funcionalización de las columnas, se siguió el mismo procedimiento [244] descrito para la activación y obtención de capilares basados en c-SWCNTs en matriz de SiO₂/PEG (apartado anterior). No obstante, para capilares de PDMS, los c-MWCNTs también fueron probados. Para conseguir esto, la única modificación necesaria es preparar una dispersión de 5 mg/mL de c-MWCNTs en lugar de usar c-SWCNTs. En la **Figura 40**, se esquematiza la obtención de capilares de PDMS funcionalizados.

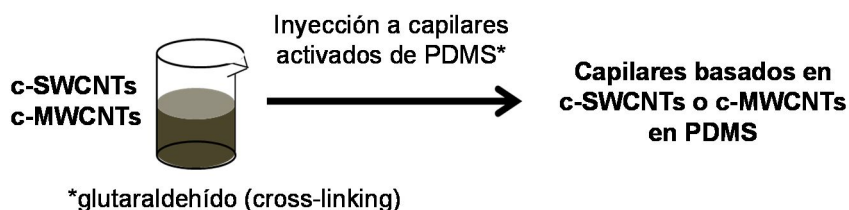


Figura 40. Esquema de la síntesis de capilares basados en s-SWCNTs o c-MWCNTs en PDMS.

d) Columnas capilares basadas en un gel de PDMS con NPs de Fe₃O₄

Las superficies internas de capilares de SiO₂ fundida de i.d. de 75 μm fueron recubiertas con NPs de Fe₃O₄ esféricas incrustadas en una matriz de PDMS. Para conseguir esto, una base de elastómero de silicona y un agente de curado (Sylgard 184) fueron mezclados en proporción 10:1 (w/w) [246]. Las NPs de Fe₃O₄, cuya síntesis fue explicada en la sección 3.4.1, se añadieron a la mezcla. Se obtuvo un gel. Finalmente, este gel se hizo pasar por el capilar de SiO₂ fundida previamente activado con una disolución 1:1 (v/v) MeOH/HCl por 30 min.

Los capilares funcionalizados, cuyo procedimiento de síntesis ha sido descrito, y los de PDMS comerciales se utilizaron en las metodologías desarrolladas en esta Tesis que involucran la IT-SPME o su versión magnética. En el análisis de diclofenaco, se hace un estudio comparativo de todas las fases adsorbentes en un método basado en la IT-SPME-nano-LC (contrastando resultados con IT-SPME-Cap-LC). Por su parte, para pesticidas se utilizaron los capilares magnéticos en la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC. Por último, los capilares basados en c-SWCNTs en PDMS se ensayaron en el análisis de AgNPs y AuNPs.

3.4.3 Síntesis de AgNPs

Como se ha comentado en la sección 1.5.3.3, en el presente trabajo se han desarrollado tres métodos de caracterización de AgNPs basados en la espectrofotometría UV-Vis, la Cap-LC-DAD y la IT-SPME-Cap-LC. En el primero de ellos, se cuantifica la plata catiónica que no se ha transformado en NPs para estimar los rendimientos de las síntesis utilizando un procedimiento de derivatización con TMB (la reacción entre la Ag^+ y la TMB produce una forma oxidada de esta última con coloración azul). Por ello y para realizar un estudio más completo, se siguieron procedimientos para obtener AgNPs de distinta naturaleza (fotoquímica y térmicas con agente reductor citrato o NaBH_4). En cuanto a los métodos cromatográficos en cuestión, bajo el método de Frank [239] modificado por Mirkin [240] se sintetizaron NPs con diferentes tamaños y formas de manera sencilla lo que permite estudiar fácilmente las variaciones de estas propiedades en el sistema. En total, se utilizaron 4 procedimientos.

a) Síntesis fotoquímica

Se siguió el procedimiento propuesto por Stamplecoskie y Scaiano [247]. Brevemente, disoluciones acuosas conteniendo AgNO_3 (0.2 mM), I-2959 (0.2 mM) y citrato trisódico (1 mM) se purgaron con N_2 por 20 min para eliminar el O_2 y luego, se expusieron a irradiación ($h\nu$) UV (tipo UVA entre 320-400 nm) de $\lambda=350$ nm en un fotorreactor LZC-4 Luzchem con lámparas UVA (FL8BLB de 8 W). En la **Figura 41** se muestra un esquema de las reacciones que tienen lugar en esta síntesis fotoquímica.

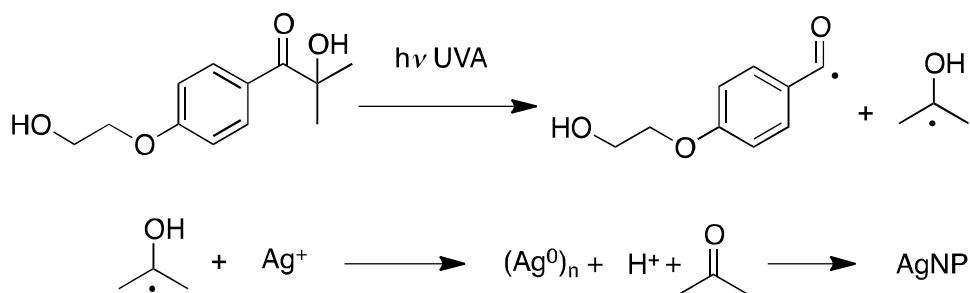


Figura 41. Síntesis fotoquímica de AgNPs empezando en la generación de un radical cetilo por la excitación del I-2959 bajo irradiación UVA, seguido de la reducción de la Ag^+ . Aunque el citrato no se muestra en el esquema, es fundamental para estabilizar las AgNPs producidas (agente de capping o estabilizante).

b) Síntesis térmica utilizando citrato como agente reductor

De acuerdo al procedimiento de Steinigeweg y Schlücker [248] (una variación del método clásico de Lee and Meisel [249], que mejora la monodispersidad de las NPs) 50 mL de una mezcla glicerol:agua (40% (v/v) de glicerol) fue agitada (con barra agitadora de 2.5 cm a 1200 rpm) en un frasco de 100 mL y calentada hasta 95°C. Luego, 9 mg de AgNO_3 , y 1 min después, 1 mL de citrato trisódico (3% (w/v)) se añadieron a la mezcla de disolventes. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 95°C. Las AgNPs se almacenaron en tubos plásticos de centrifuga una vez alcanzada la temperatura ambiente.

c) Síntesis térmica utilizando NaBH_4 como agente reductor

Siguiendo el método descrito por Wan y colaboradores [250], 20 mL de una disolución de citrato (1%) y 75 mL de agua fueron añadidos en un frasco redondo y la mezcla se calentó hasta 70°C por 15 min. Después de esto, 1.7 mL de una disolución de AgNO_3 (107 mg/L para la concentración de Ag^+) se introdujeron a la mezcla de reacción, seguido de una rápida adición de 2 mL de NaBH_4 (recién preparado). Se ensayaron dos concentraciones de este último (0.1 y 0.04% (w/v)). La mezcla de reacción fue mantenida a 70°C bajo agitación vigorosa durante 1 h y luego, enfriada a temperatura ambiente. Se añadió agua para que el volumen final de la dispersión fuese de 100 mL.

d) Método de Frank-Mirkin

Las AgNPs se prepararon reduciendo los iones Ag^+ con NaBH_4 en presencia de aniones citrato [239]. Para controlar los tamaños y formas de las partículas resultantes, H_2O_2 puede ser adicionado a la mezcla [240].

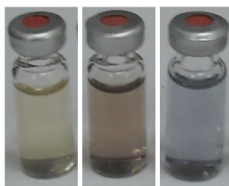


Figura 42. Síntesis de AgNPs siguiendo el método de Frank-Mirkin. La primera síntesis de color amarillo se obtuvo sin añadir ni H_2O_2 ni KBr ; la segunda de color rojo añadiendo H_2O_2 ; la tercera de color azul, H_2O_2 y KBr .

Citrato trisódico (1% (w/v), 1.3 mL), AgNO_3 (1% (w/v), 0.064 mL), H_2O_2 (30% (v/v), 0.1 mL), opcionalmente KBr (1 mM, 0.086 mL) y NaBH_4 (0.1% (w/v), 0.94 mL) fueron

añadidos secuencialmente en un frasco de 20 mL para finalmente ser diluidos con agua y así obtener un volumen final de 5 mL. La mezcla de reacción se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se almacenaron y guardaron en la oscuridad luego de ser diluidas con agua (dilución 1:8).

Cambiar el tiempo de agitación, el volumen de agua en la última etapa de dilución y usar o no H_2O_2 son los factores responsables de un tamaño final específico de las NPs (diámetro de partícula promedio) [251]. Cuando se añade KBr a la mezcla, AgNPs con formas de prismas triangulares son sintetizados (nanoprismas de plata, que dan una coloración azul a la dispersión). Si no es el caso, se obtienen NPs esféricas. En la **Figura 42** se pueden ver 3 síntesis de AgNPs: la primera obtenida sin añadir ni H_2O_2 ni KBr; la segunda añadiendo H_2O_2 y en la tercera, ambos.

3.5 Condiciones experimentales

La **Tabla 22** muestra las condiciones experimentales de los métodos cromatográficos empleados; las correspondientes a GC se pueden ver en la **Tabla 23**. Las fases móviles de LC se filtraron con membranas de nylon de $0.45\ \mu\text{m}$ y desgasificaron en baño de ultrasonidos (a excepción de los PAHs, en que se utilizó helio).

Para el diclofenaco, los detalles de los capilares utilizados para la IT-SPME se darán en la sección relativa a su estudio. El flujo y la composición para la nano-LC-DAD acoplada a IT-SPME que aparecen en la **Tabla 22** corresponden a los valores de operación de la nanobomba. Para la inyección, como se ha señalado previamente, se utilizó una bomba capilar operando a flujo de $50\ \mu\text{L}/\text{min}$ y una fase móvil de composición MeCN:agua 10:90 (v/v).

En cuanto a los pesticidas, se empleó una columna capilar comercial de PDMS TRB-5 (35 cm de largo, $0.32\ \text{mm}$ de i.d., Teknokroma) para la IT-SPME-Cap-LC (método comparativo) o la MSPE-IT-SPME-Cap-LC y un capilar magnético (60 y 15 cm de largo dependiendo del analito, $0.075\ \text{mm}$ de i.d.) cuya síntesis está descrita en la sección 3.4.1 para la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC (que a campo magnético cero es IT-SPME-Cap-LC). En ambos casos, se utilizó una fase móvil en modo isocrático con composición variable dependiendo de los analitos: para OPs fue MeOH:agua en proporción 95:5 (v/v); en cambio para triazinas, 85:15 (v/v). Cuando se realizó la MSPE-IT-SPME-Cap-LC, las condiciones fueron distintas: 1.5 mL de muestra o patrón (seguido de $50\ \mu\text{L}$ de agua para lavar) se inyectaron en el sistema empleando como fase móvil MeCN:agua en proporción 70:30 (v/v) a $15\ \mu\text{L}/\text{min}$. El objetivo de este procedimiento es probar la eficacia adsorbente (en una técnica fuera de línea) del nanomaterial cuya síntesis se discute también en la sección 3.4.1.

Tabla 22. Condiciones experimentales para los métodos de LC acoplados a IT-SPME utilizados en la Tesis

Análito	Método	IT-SPME	Columna LC	Viny.	Fase móvil	Elución	Flujo	λ_{med} (nm)
Diclofenaco	nano-LC-DAD	Capilares sintetizados	Zorbax 300 SB C18	0.94 μ L	MeCN-Agua	Isocrática	0.05-0.3 μ L/min	280
	Cap-LC-DAD	Capilares comerciales	50 mm x 75 μ m, 3.5 μ m	5.64 μ L	50:50 (v/v)			
	Cap-LC-DAD	Capilar magnético ^a	Zorbax SB C18	200 μ L	MeCN-Agua	Gradiente	10 μ L/min	
			15 cm x 0.5 mm, 3.5 μ m (Agilent)					
OPs Triazinas	Cap-LC-DAD	Capilar magnético ^b	Zorbax SB C18	3 mL ^c	MeOH-Agua	Isocrática	6 μ L/min	230
		y Capilares comerciales	15 cm x 0.5 mm, 3.5 μ m (Agilent)	100 μ L	variable (por analito)			230
AgNPs	Cap-LC-DAD	PDMS TRB-35 ^d	Jupiter C18 ^{de}	2-20 μ L ^{df}	SDS (10 mM)	Isocrática	5-20 μ L/min	400
AuNPs		20-70cm x 0.32mm, 3 μ m (Teknokroma)	5cm x 0.5 mm, 5 μ m (Phenomenex)		Na ₂ S ₂ O ₃ (1 mM) AcNH ₄ (10 mM)			530
AgNPs ^f								600
PAHs	HPLC-FLD	PDMS TRB-35	PAHs LiChrospher	3 mL	Agua	Gradiente	0.8-1.5 mL/min	λ_{ex} 235, 265
		70-90cm x 0.32mm, 3 μ m (Teknokroma)	250mm x 4.6 mm, 5 μ m		MeOH MeCN			λ_{em} 335, 375 425, 475

^a sin Magnetic-IT-SPME, ^b Magnetic-IT-SPME (también IT-SPME), ^c lavado 300 μ L MeOH, ^d optimizado, ^e tamaño de poro 300 Å , ^f 2 μ L sin IT-SPME, ^g nanoprismas

LC cromatografía líquida, IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo, Viny. volumen de inyección, λ_{med} longitud de onda de medida, nano-LC nanocromatografía líquida, DAD detector de fila de diodos, Cap-LC cromatografía líquida capilar, OPs compuestos organofosforados, AgNPs nanopartículas de plata, PDMS polidimetilsiloxano, TRB porcentaje de polidifenilsiloxano, AuNPs nanopartículas de oro, PAHs hidrocarburos aromáticos policíclicos, HPLC cromatografía líquida de alta resolución, FLD detector de fluorescencia, λ_{ex} longitud de onda de excitación, λ_{em} longitud de onda de emisión, Magnetic-IT-SPME microextracción en fase sólida en tubo magnética.

Tabla 23. Condiciones experimentales para los métodos de GC utilizados en la Tesis

Método	Ion. (En)	Analito	IS	Columnas	Gases-Flujo	Temp (°C)	Iny. (SC)	Viny (µL)	Mod. Ad.
GC-MS/MS	EI (70 eV)	Der. PAHs	optimizar	Optima 5MS (Macherey-Nagel) 30mx0.32mm, 0.25µm	Helio (arrastre)	T [°] fue 150-210	Splitless	1-2	Full scan
					1-2 mL/min	T [°] chl 300	(0.7)	MRM	
						T [°] iny 250-300			
						T [°] hor optimizar			
GC-MS	EI (70 eV)	PAHs Der. PAHs	Naf-d8 optimizar	Optima 5MS (Macherey-Nagel) 30mx0.32mm, 0.25µm	Helio (arrastre)	T [°] fue 150-210	Splitless	3	Full scan
					1-2 mL/min	T [°] chl 300	(0.7)	SIM	
						T [°] iny 300			
						T [°] hor optimizar			
GC-MS	CI (45 eV)	Der. PAHs	optimizar	DB-5ms (Agilent) 30mx0.32mm, 0.25µm	Helio (arrastre)	T [°] fue 150-210	Splitless	3	Full scan
					1-2 mL/min	T [°] chl 300	(0.7)	SIM	
					Metano (reacción)	T [°] iny 300			
					40% equipo	T [°] hor optimizar			

GC cromatografía de gases, Ion. ionización, En energía, IS patrón interno, Temp. temperaturas, Iny. inyección, SC anchura de scan, Viny volumen de inyección, Mod. Ad. modo de adquisición, MS/MS espectrometría de masas en tándem, EI impacto electrónico, Der. PAHs derivados de hidrocarburos aromáticos policíclicos, Optima 5 MS análoga a PDMS TRB 5, T[°]fue temperatura de la fuente, T[°]chl temperatura de transferencia de línea, MRM modo de monitorización de reacción, T[°]iny temperatura del inyector, T[°]hor temperatura del horno (programa), MS espectrometría de masas, PAHs hidrocarburos aromáticos policíclicos, Naf-d8 nafta leno deuterado, SIM modo de monitorización selectiva de iones, CI ionización química, DB-5ms (5% fenil) metilpolisiloxano.

El valor de i.d. del capilar magnético utilizado es de 0.075 mm (75 μm) por debajo del rango de trabajo para Cap-LC (100-300 μm) que se aprecia en la **Tabla 2** de la sección 1.4.2. No obstante, ese rango se remite a los valores habituales reportados en la bibliografía y no son excluyentes. No hubo problemas de presión al trabajar con dicho capilar en el método desarrollado.

En el caso del análisis de AgNPs, dependiendo del experimento se variaron algunos parámetros (flujo de la fase móvil, volumen de inyección). Se utilizaron otros capilares para la IT-SPME (PDMS TRB-5 y un capilar basado en c-SWCNTs en matriz de PDMS TRB-5), como también otras columnas analíticas aparte de la seleccionada que se indica en la **Tabla 22**: Zirchrom Sachtapore-RP (5 μm , 100 Å, 0.3 mm i.d., 10 cm), Zorbax SB-C18 (5 μm , 80 Å, 0.5 mm i.d., 3.5 cm) y Zorbax SB-C18 (3.5 μm , 80 Å, 0.5 mm i.d., 3.5 cm). Nota: las magnitudes hacen referencia a tamaño de partícula (μm), poro (Å), i.d. (mm) y largo (cm).

En la determinación de PAHs, se utilizaron 2 métodos que difieren en la técnica de extracción siendo la MSPD o la UAE. Para el primero, se varió la ganancia del detector de 17 a 18 para estudiar algunos de los PAHs y la longitud de onda de excitación fue fija (265 nm); en cambio, para el segundo método se empezó a 235 nm y luego se pasó a 265 nm (más detalles en la sección dedicada a este método). En ambos casos, las longitudes de onda de detección para cada analito se indicarán en la sección correspondiente al método en cuestión.

Para los métodos de GC, los programas de temperatura del horno, así como las masas seleccionadas en los diferentes modos serán discutidos en la sección relativa al análisis de PAHs y sus derivados por GC y MS.

3.6 Muestras

En la **Tabla 24** se pueden ver todas las muestras analizadas por analito en la presente Tesis. Las aguas de río y residuales se almacenaron en contenedores de vidrio oscuro a 4°C. Para utilizar la Magnetic-IT-SPME, las aguas se filtraron con membranas de nylon 0.45 μm . En los métodos de análisis de AgNPs se estudiaron diversas muestras: las propias síntesis, AuNPs, surfactantes y suelos. Las NPs se almacenaron en viales en la oscuridad, en tanto que los suelos se mantuvieron en botellas a temperatura ambiente. En cuanto a los sedimentos marinos en los que se analizaron los PAHs, éstos fueron recolectados en diferentes puntos de la Comunidad Valenciana, luego secados, homogeneizados y mantenidos en viales de vidrio a 4°C. Los sedimentos contaminados fueron obtenidos del grupo de investigación holandés QUASIMEME (Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe program) para estudios interlaboratorio. Por

último, en el análisis de PAHs y sus derivados en el aire, filtros de fibra de vidrio fueron puestos dentro de captadores pasivos de aire y dejados al aire libre cerca de la Universidad de Estrasburgo. También, se analizaron materiales de referencia certificados (CRM).

Tabla 24. Muestras por analito estudiadas en la presente Tesis.

Analito	Muestras
Diclofenaco	Tabletas de Voltarén (Novartis) Aguas de río de la Comunidad Valenciana
OPs	Aguas residuales, efluentes de EDARs de Valencia
Triazinas	Aguas de río de la Comunidad Valenciana
AgNPs	Síntesis esféricas de AgNPs Nanoprismas de plata Síntesis fotoquímicas y térmicas Síntesis comerciales de AuNPs ¹ Surfactantes (BZKC, CTAB) ¹ Suelos de Valencia (compost, huerto, monte, urbano) ¹
PAHs	Sedimentos marinos de la Comunidad Valenciana Sedimentos marinos contaminados (QUASIMEME)
PAHs y derivados	Filtros de fibra de vidrio (región Alsaciana), CRMs

¹ fueron estudiados con el método desarrollado para el análisis de AgNPs

Capítulo 4.

Diclofenaco en aguas

4.1 Columnas capilares empleadas para la determinación de diclofenaco en aguas

Diferentes materiales conteniendo en algunos casos nanoestructuras o NPs y en otros, fases adsorbentes poliméricas fueron inmovilizados en columnas capilares para mejorar la eficiencia de extracción de compuestos orgánicos (en este caso, diclofenaco) en un método que involucra la IT-SPME. Desarrollar nuevos materiales para este propósito es una tendencia en química analítica [251-253]. Las diferentes síntesis de capilares realizadas en esta Tesis se encuentran descritas en las secciones 3.4.1 y 3.4.2 de la Metodología Experimental. En la **Tabla 25** se muestran las diferentes características de las columnas capilares empleadas en el método desarrollado basado en la IT-SPME-nano-LC-DAD y en el método IT-SPME-Cap-LC-DAD para contrastar resultados en una etapa posterior de la optimización (sistemas explicados en las secciones 3.3.2.3 y 3.3.2.1 respectivamente).

Tabla 25. Características de los capilares utilizados en el estudio del diclofenaco.

Capilar	Fase Adsorbente	Longitud (mm)	i. d. (mm)	V _{int} ^a (μL)
Capilar 1	PDMS TRB-5	170	0.1	1.34
Capilar 2	c-SWNTs en PDMS TRB-5	170	0.1	1.34
Capilar 3	c-SWNTs en PDMS TRB-5	130	0.1	1.02
Capilar 4	c-MWNTs en PDMS TRB-5	170	0.1	1.34
Capilar 5	NPs Fe ₃ O ₄ esféricas en SiO ₂ /PEG	190	0.1	1.49
Capilar 6	NPs Fe ₃ O ₄ esféricas en SiO ₂ /PEG	130	0.1	1.02
Capilar 7	NPs Fe ₃ O ₄ esféricas en SiO ₂ /PEG	120	0.1	0.94
Capilar 8	SiO ₂ /PEG c-SWNTs	122	0.1	0.96
Capilar 9	NPs Fe ₃ O ₄ esféricas en SiO ₂ /PEG	131	0.075	0.58
Capilar 10	NPs Fe ₃ O ₄ esféricas en SiO ₂ /PEG	150	0.075	0.66
Capilar 11	NPs Fe ₃ O ₄ bastones en SiO ₂ /PEG	150	0.075	0.66
Capilar 12	SiO ₂ /PEG	250	0.075	1.1
Capilar 13	Gel PDMS-Fe ₃ O ₄	350	0.075	1.55
Capilar 14 ^b	NPs Fe ₃ O ₄ esféricas en SiO ₂ /PEG	310	0.1	2.43

^avolumen interno, ^bcapilar utilizado sólo en el método IT-SPME-Cap-LC

Cabe señalar que como materiales adsorbentes para el análisis de OCs (ECs incluidos) también se han empleado otras fases extractivas entre las que se encuentran los polímeros de impronta molecular (MIPs) [254], el polipirrol (PPY) [255] y rellenos monolíticos [256,257].

Los capilares de la **Tabla 25** (excepto el capilar 14) han sido utilizados para el análisis del diclofenaco, fármaco de uso masivo y miembro emblemático de los ECs. Este compuesto es elegido con frecuencia como analito diana en estudios de fármacos en aguas [258]. Se hace uso de un sistema nanocromatográfico (cuyos parámetros operacionales pueden encontrarse en la sección 1.4.2 de la Introducción) que se caracteriza por poseer elevada sensibilidad, bajo consumos de disolventes y muestra (reduce el efecto matriz), así como también provee separaciones altamente eficientes [259]. Dicho sistema (sección 3.3.2.3 de la Metodología Experimental) se acopla a la IT-SPME siguiendo el montaje con doble válvula presentado en la **Figura 36** e inyectando las muestras o patrones como se indica en la sección en cuestión (posiciones de las válvulas representadas en la **Figura 37**). En el método propuesto (cuyas condiciones experimentales se aprecian en la **Tabla 22** de la sección 3.5 de la Metodología Experimental), se deben optimizar diversos parámetros tales como tiempos de transferencia, dimensiones óptimas del capilar (largo e i.d.), naturaleza del adsorbente y pH. En una primera etapa, las columnas capilares fueron caracterizadas por SEM. Para más información, consultar el Anexo 7.

4.2 Caracterización por SEM de las columnas capilares

La **Figura 43** muestra las imágenes obtenidas por SEM de los capilares ensayados (escogiendo uno por cada material adsorbente que se utilizó). Para las columnas de PDMS TRB-5, así como para las basadas en c-SWCNTs y c-MWCNTs las imágenes corresponden a las **Figuras 43 a**, **43 b** y **43 c** respectivamente. El capilar comercial de PDM TRB-5 presentó numerosos pliegues superficiales debido a la funcionalización de los grupos difenilo y una buena adsorción de los analitos puede esperarse. Incluso esta adsorción puede incrementarse en el caso de haber CNTs (c-SWCNTs o c-MWCNTs), considerando que estas nanoestructuras aumentaron la porosidad del material y en consecuencia, la superficie de contacto.

En cuanto a los capilares basados en NPs de Fe_3O_4 , esféricas o con forma de bastón, en matriz de SiO_2/PEG (donde los dos adsorbentes fueron inmovilizados en capilares de SiO_2 fundida) se siguió un procedimiento parecido y resultados similares fueron obtenidos. Las imágenes SEM para ambos capilares, con NPs esféricas y en forma de bastón, son mostradas en las **Figuras 43 e** y **43 f** respectivamente. El espesor del recubrimiento se estimó en unas 10 μm para estos capilares. Por otra parte, en la **Figura 43 d** se ve la superficie de un capilar de SiO_2 fundida comercial y sin funcionalizar. Si se compara esta imagen con las 2 anteriores, la presencia del nanomaterial adsorbente aporta una red

altamente porosa donde los analitos pueden ser retenidos de manera más eficiente debido a las interacciones con las cadenas alquílicas de las micelas de CTAB [82].

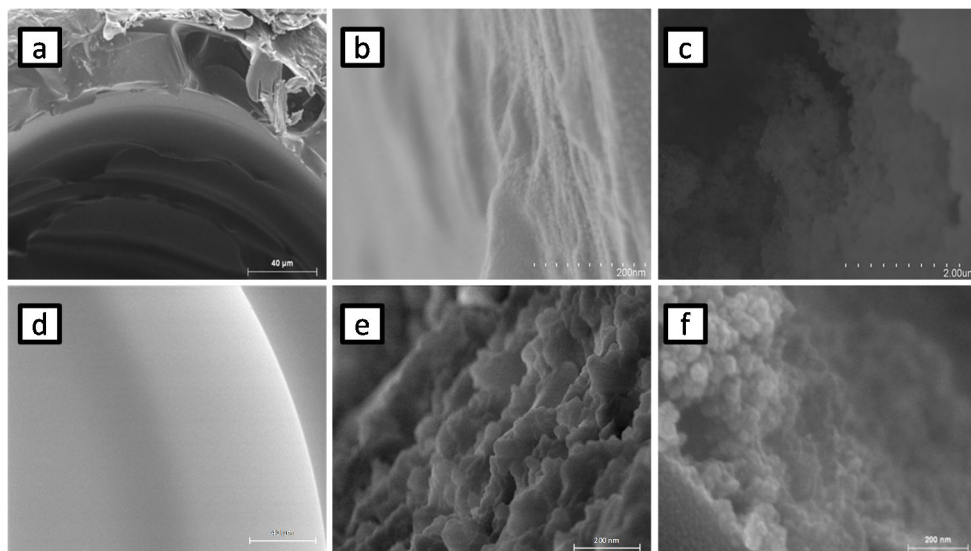


Figura 43. Imágenes SEM para la caracterización de los capilares (vista transversal): a) capilar comercial de PDMS TRB-5 (40 μm), b) capilar basado en c-SWCNTs en PDMS TRB-5 (200 nm), c) capilar basado en c-MWCNTs en PDMS TRB-5 (2 μm), d) capilar comercial de SiO₂ fundida (40 μm), e) capilar basado en NPs de Fe₃O₄ esféricas en matriz de SiO₂/PEG (200 nm) y f) capilar basado en NPs de Fe₃O₄ en forma de bastón en matriz de SiO₂/PEG (200 nm). Para más información ver la Tabla 25.

En este momento, es importante señalar que todos los experimentos posteriores se realizaron en duplicado (n=2), salvo que se especifique de otra manera.

4.3 Optimización de las condiciones nanocromatográficas

El sistema de nano-LC (ver **Figura 36** de la sección 3.3.2.3 de la Metodología Experimental) estaba compuesto de un bucle de inyección PEEK de largo variable (por lo tanto, volumen interno variable) conectado a la válvula 1 y diferentes columnas capilares (ver **Tabla 25**) conectadas a la válvula 2. Como se puede ver en la sección 3.5 de la Metodología Experimental, las fases móviles consistieron en una mezcla 10:90 (v/v) MeCN:agua para la bomba capilar que llena el loop de la válvula 2 desde la válvula 1 (a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) y 50:50 (v/v) MeCN:agua para la nanobomba que se encarga de la separación. Dependiendo de las circunstancias, el flujo de la nanobomba (fijado en 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) se

disminuyó (para evitar sobrepresiones del sistema) o se incrementó (para reducir los tiempos de análisis si la presión lo permitiese). Con este propósito, se realizaron inyecciones de un patrón de diclofenaco de 1 $\mu\text{g/mL}$ llenando por completo el loop PEEK. Un loop de inyección PEEK de volumen interno de 8 μL fue seleccionado. Por otra parte, los patrones de diclofenaco se prepararon en agua acidificada (pH de 3.8) considerando el valor de pK_a de este compuesto (en torno a 4). Trabajando bajo estas condiciones, una proporción mayor de diclofenaco en su forma neutra se aseguraba y por consiguiente, una retención más alta en la columna capilar apolar.

Como se puede deducir de lo expuesto a lo largo de esta Tesis, el mayor desafío del acoplamiento de las partes del sistema propuesto ha sido combinar dimensiones capilares y nanocromatográficas. Sistemas cromatográficos con 2 válvulas, 2 bombas y una columna capilar (además de la columna analítica de separación) han sido descritos en la bibliografía [256,260-264]. Sin embargo, la mayoría de estos métodos involucran Cap-LC utilizando columnas monolíticas para la IT-SPME [256,260-263] y no IT-SPME-nano-LC. Además, una válvula automática ha sido usada antes [263] como la que se emplea en el método de esta Tesis (válvula 2). Sólo existe un estudio de nano-LC (con detección de MS) [264] que propone un sistema de 2 válvulas de configuración similar, pero en este caso las muestras son directamente inyectadas a una columna monolítica de captura (acoplada a una válvula). La fase móvil pasa por la otra válvula del sistema que a su vez está conectada a un loop con una disolución de acondicionamiento (necesaria para la MS), a continuación por la columna de captura y finalmente por el resto del sistema. En otras palabras, no se realizó una transferencia del analito desde una válvula a la otra como en el presente trabajo. En éste, adaptando elementos de otros métodos, se propone una nueva configuración de sistema.

Para lograr un acoplamiento exitoso de las distintas partes del sistema, son factores cruciales la inyección en 2 pasos (discutida en la sección 3.3.2.3), la automaticidad del sistema (en la válvula 2) y el tiempo de transferencia controlado entre ambas válvulas.

4.4 Tiempo de transferencia

Como se ha explicado, el tiempo que tarda la fase móvil, impulsada por la bomba capilar, en transportar la muestra o patrón desde el loop PEEK hasta la columna capilar se ha definido como el tiempo de transferencia, un parámetro que debe ser optimizado para cada capilar ensayado que difieren en naturaleza, largo e i.d. (ver **Tabla 25**). Experimentalmente, este parámetro se puede medir como el tiempo que se cuenta desde el momento en que se enciende la bomba capilar hasta que se apague. Se realizaron inyecciones de un patrón de diclofenaco de 400 ng/mL (300 ng/mL para capilares con i.d. de 0.075 mm) para obtener el tiempo de transferencia en el cual se consigue la señal más intensa.

Los resultados de los capilares ensayados se muestran en la **Figura 44**. Para clarificar la discusión, dos grupos de capilares pueden ser diferenciados: columnas capilares basadas en matrices de SiO₂ y de PDMS. Algunos capilares exhibieron los mismos perfiles de variación de tiempo de transferencia. Adicionalmente, una parte de ellos permitió trabajar con flujos más altos (capilares 5, 6, 7 y 8) y otros más bajos (capilares 2, 3, 4 y 9) que 0.2 µL/min. Las presiones de trabajo fueron muy altas para el capilar 13 y no se realizaron más estudios con éste. Se pueden establecer ciertas tendencias. De entre los dos grupos, una variación similar del tiempo de transferencia se obtuvo: con valores óptimos que iban desde los 15 a 25 s. Si se disminuía el largo del capilar, los tiempos de transferencia eran más cortos. Sin embargo, cuando el i.d. era menor, los tiempos de transferencia aumentaron. La explicación de este hecho se haya en que bajo este nuevo i.d., los flujos deben ser reducidos para así evitar sobrepresiones y por ende, los tiempos de análisis se alargan.

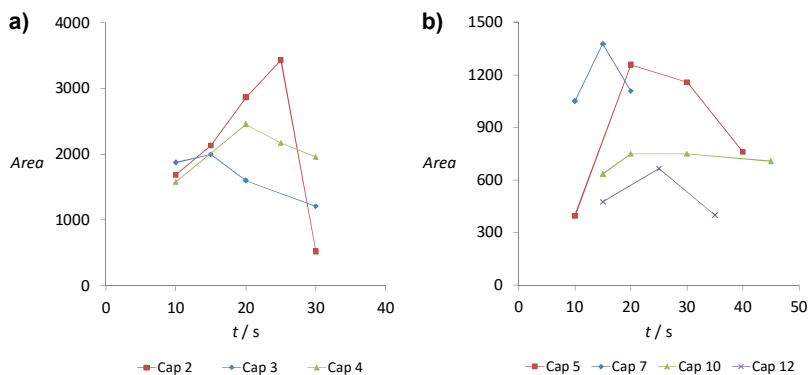


Figura 44. Optimización del tiempo de transferencia. a) Columnas capilares basadas en PDMS. b) Columnas capilares basadas en SiO₂. Nota: perfiles similares se obtuvieron para el resto de los capilares ensayados. El capilar 1 fue similar al 3 (15 s), 6 y 8 al 7 (15 s), 9 y 11 al 10 (20 s). Para mayor información, ver la Tabla 25.

En resumen, los tiempos de transferencia óptimos fueron de 15 s para los capilares 1, 3, 6, 7 y 8; 20 s para los capilares 4, 5, 9, 10 y 11; 25 s para los capilares 2 y 12.

4.5 Efectos en el sistema de las dimensiones de las columnas capilares: longitud e i.d.

Estos dos parámetros pueden ser evaluados en términos de la intensidad de la señal analítica (área de pico), perfil del pico y tiempo de retención para el diclofenaco. Inyecciones de un patrón de diclofenaco de 400 ng/mL fueron hechas al tiempo óptimo de transferencia dependiendo del capilar utilizado.

Para estudiar el efecto del largo del capilar, se compararon los capilares 2 (170 mm) y 3 (130 mm) para los capilares basados en PDMS y los capilares 5 (190 mm), 6 (130 mm) y 7 (120 mm) para los basados en SiO₂. Los resultados (i.e. los cromatogramas obtenidos) se presentan en la **Figura 45 a**.

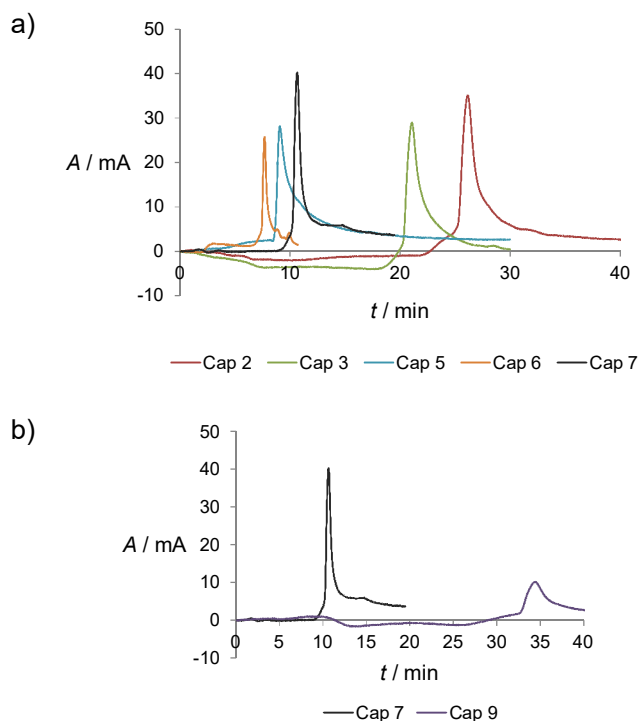


Figura 45. Optimización de las dimensiones de los capilares. Cromatogramas para un patrón de diclofenaco de 400 ng/mL. a) Efecto del largo del capilar para columnas basadas en PDMS (capilares 2 y 3) y para las basadas en SiO₂ (capilares 5, 6 y 7). b) Efecto del i.d. para columnas basadas en SiO₂ (capilares 7 y 9).

Cuando los capilares de PDMS fueron comparados, las áreas y los perfiles de pico fueron similares, pero el tiempo de retención disminuyó de 26 a 21 min cuando el capilar más corto (capilar 3) fue utilizado (el flujo fue de 0.1 μL/min en los dos casos). En cuanto a los capilares 5 y 6, el flujo fue de 0.3 μL/min; para el capilar 7, 0.2 μL/min. Los tiempos de retención más bajo y alto se consiguieron para los capilares 6 (7.7 min) y 7 (11 min) respectivamente. Para el capilar 5 (tiempo de retención de 10 min), un pico de área mayor fue obtenido, pero su perfil (en términos de anchura y altura de pico) no fue tan satisfactorio

como los obtenidos para los otros dos. El capilar 7 (largo de 120 mm) proporcionó el mejor perfil de pico y presentó el mejor resultado global, considerando que el área fue mayor a la obtenida con el capilar 6.

Por lo tanto, mejores resultados se obtuvieron cuando la longitud del capilar se redujo tanto en capilares basados en PDMS como en los basados en SiO₂. La selección de la naturaleza del adsorbente será tratada en secciones posteriores.

Por su parte, el efecto del i.d. se evaluó comparando dos capilares con el mismo adsorbente como los capilares 7 (i.d. de 0.1 mm) y 9 (0.075 mm). Cuando se disminuye este parámetro, el volumen interno del capilar también lo hace. No obstante, teniendo en cuenta que el espesor de la fase adsorbente (aproximadamente 10 μm) representa una fracción pequeña del diámetro interno sin modificar, la densidad del adsorbente aumenta así como también el contacto con los analitos. A pesar de esto, experimentalmente, trabajar con capilares de i.d. de 0.075 mm supuso una reducción del flujo ya que el sistema no pudo tolerar flujos superiores a 0.1 μL/min por el riesgo de una sobrepresión. El empleo del capilar 7 mejoró tanto el área como el perfil de pico además del tiempo de retención en comparación al capilar 9. Los cromatogramas se muestran en la **Figura 45 b**. Así, debido a los problemas experimentales y extensiones de los tiempos de análisis para los capilares con un i.d. más pequeño (el tiempo de retención del diclofenaco fue de 35 min para el capilar 9 a un flujo de 0.05 μL/min), las columnas capilares con i.d. más grandes fueron seleccionadas ya que proporcionan mejores resultados.

4.6 Calibración de la IT-SPME-nano-LC

Aunque algunos capilares mostraron mejores características que otros en el análisis del diclofenaco, se obtuvieron las curvas de calibrado en todos los casos para así evaluar la linealidad y la sensibilidad en términos del coeficiente de determinación (R^2) y la pendiente de la curva respectivamente. La **Tabla 26** muestra los parámetros analíticos del proceso de calibración en un intervalo de trabajo de 0-400 ng/mL para todos los capilares estudiados. Información adicional sobre las columnas puede encontrarse en la **Tabla 27**.

Cuando las columnas basadas en PDMS TRB-5 (capilares 1-4) son comparadas, los parámetros analíticos demostraron que la presencia de CNTs mejoró la eficiencia de extracción y la sensibilidad para el diclofenaco en contraste con los resultados obtenidos para la columna capilar de PDMS TRB-5 comercial y sin funcionalizar. Para este último parámetro, el uso de capilares modificados con c-SWCNTs (capilares 2 y 3) obtuvo mejores resultados que el capilar basado en c-MWCNTs (capilar 4). Para este grupo, la linealidad fue excelente. Finalmente, el empleo de la columna de 130 mm basada en c-SWCNTs en PDMS TRB-5 (capilar 3) es la mejor opción ($R^2 = 0.9978$ y pendiente (b) = 4.8 mL/ng). El peor resultado se consiguió con la columna comercial sin modificar. El perfil del pico

cromatográfico puede explicar el valor alto de la ordenada en el origen (a) y baja pendiente (ver **Tabla 26**).

Tabla 26. *Parámetros analíticos obtenidos para cada columna capilar ensayada durante la calibración del método IT-SPME-nano-LC-DAD.*

Capilar	$y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) \cdot x$		
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2
Capilar 1	-145 ± 77	0.72 ± 0.06	0.9941
Capilar 2	-20 ± 33	4.5 ± 0.2	0.9961
Capilar 3	-47 ± 40	4.8 ± 0.2	0.9978
Capilar 4	3 ± 34	3.0 ± 0.2	0.9949
Capilar 5	310 ± 124	2.5 ± 0.4	0.9324
Capilar 6	-7 ± 14	1.77 ± 0.05	0.964
Capilar 7	80 ± 48	2.7 ± 0.2	0.9902
Capilar 8	80 ± 48	0.42 ± 0.2	0.9813
Capilar 9	-27 ± 47	2.0 ± 0.2	0.9822
Capilar 10	-46 ± 9	2.34 ± 0.05	0.9995
Capilar 11	360 ± 60	1.4 ± 0.3	0.9446
Capilar 12	50 ± 20	1.9 ± 0.1	0.9958

Para las columnas capilares basadas en NPs de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG con i.d. de 0.1 mm (capilares 5-7), el uso de la columna de 120 mm (capilar 7) logró la mejor linealidad ($R^2 = 0.9902$) y sensibilidad (pendiente = 2.7 mL/ng). Adicionalmente, una columna capilar basada en c-SWCNTs en matriz de SiO_2/PEG (capilar 8) fue ensayada, pero los resultados no fueron satisfactorios (la pendiente más baja obtenida como se ve en la **Tabla 26**). El valor elevado de la ordenada en el origen para el capilar 5 se debió probablemente a un pobre ajuste de calibración (valor R^2).

Tabla 27. Características adicionales de los capilares utilizados en los métodos de IT-SPME-nano-LC-DAD y de IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Capilar	~Espesor del adsorbente (μm)	Tiempo de transferencia (s)	Flujo ^a ($\mu\text{L}/\text{min}$)
Capilar 1	1	15	0.2
Capilar 2	1	25	0.1
Capilar 3	1	15	0.1
Capilar 4	1	20	0.1
Capilar 5	10	20	0.3
Capilar 6	10	15	0.3
Capilar 7	10	15	0.2
Capilar 8	10	15	0.3
Capilar 9	10	20	0.05
Capilar 10	10	20	0.05
Capilar 11	10	20	0.05
Capilar 12	1	25	0.2
Capilar 13	10	25	0.05
Capilar 14 ^b	10	-	-

^apara la nanobomba, ^bCapilar ensayado sólo en IT-SPME-Cap-LC

En cuanto a las columnas capilares basadas en NPs de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG con i.d. de 0.075 mm (capilares 9-12), el empleo de una columna de 150 mm de largo (capilar 10) consiguió la mejor linealidad ($R^2 = 0.9995$) y sensibilidad (pendiente = 2.34 mL/ng). Este hecho se puede explicar ya que, a este largo, el flujo pudo ser más alto sin aumentar la presión del sistema (como en el caso del capilar 9) y mejores perfiles de pico se obtuvieron. El capilar 11 fue preparado utilizando NPs de Fe_3O_4 en forma de bastones con las mismas condiciones que el capilar 10 (largo, i.d. y volumen interno), en cuya síntesis del nanomaterial adsorbente se emplean NPs esféricas [82]. Desde este resultado, se puede afirmar que al cambiar las formas de las partículas de esferas a bastones, los resultados analíticos no son tan buenos (pendiente = 1.4 mL/ng y $R^2 = 0.9446$, valores más bajos que

los obtenidos para el capilar 10, con una ordenada en el origen alta probablemente debido a un pobre ajuste de calibración).

4.7 Eficiencia de extracción

Este parámetro, señalado como el mayor inconveniente de la IT-SPME debido a su bajo valor, es un factor importante que no ha sido tratado hasta el momento. Incrementar la eficiencia de extracción por medio del uso de nuevos adsorbentes y configuraciones de sistema innovadoras ha sido una tendencia en los estudios actuales [71,256,260-264], representando el mayor desafío del presente trabajo.

La eficiencia de extracción (expresado en porcentaje) se evaluó como la razón de señales para una cantidad de analito entre la obtenida por el método desarrollado y otra que hace uso de un método IT-SPME-nano-LC sin fase extractiva. Este último método implica un sistema en donde se ha cambiado la columna capilar por un loop PEEK de 150 mm de largo (i.d. de 0.050 mm y volumen interno de 0.29 μL). En ambos métodos se utilizó un loop PEEK de 8 μL acoplado a la válvula 1. Los resultados se muestran en la **Figura 46**.

En un trabajo previo [71], en donde se empleó la IT-SPME-Cap-LC y capilares basados en NPs, la eficiencia de extracción para el diclofenaco fue de un 39%. Haciendo uso de la nanocromatografía, este parámetro se incrementó en la mayoría de los casos (e.g. capilares 2, 3, 7, 9, 10 y 11) y fue comparable en otros (e.g. capilares 4 y 5). El capilar 6 (27%) fue la única excepción y esto se podría explicar por condiciones operativas no óptimas. Los máximos alcanzados por capilares basados en NPs de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG y en c-SWCNTs en PDMS TRB-5 fueron 62 y 72% respectivamente. Además, para el capilar basado en SiO_2/PEG que fue utilizado para evaluar la presencia de las NPs de Fe_3O_4 en estructuras micelares se obtuvo una eficiencia de extracción del 30% y con ello se confirmó que la presencia de dichas NPs aumentaba este parámetro para el diclofenaco. Por otra parte, empleando el capilar 1 se consiguió una baja eficiencia de extracción (3%) lo que concuerda con los valores obtenidos para otros OCs utilizando capilares poliméricos comerciales (e.g. para triazinas analizadas en el Capítulo 5, <11%). En cuanto al capilar 8, la pobre eficiencia (11%) puede ser explicada por una unión ineficiente en el nanomaterial ($\text{SiO}_2\text{-CNTs}$) durante la síntesis del capilar (el único funcionalizado con este adsorbente).

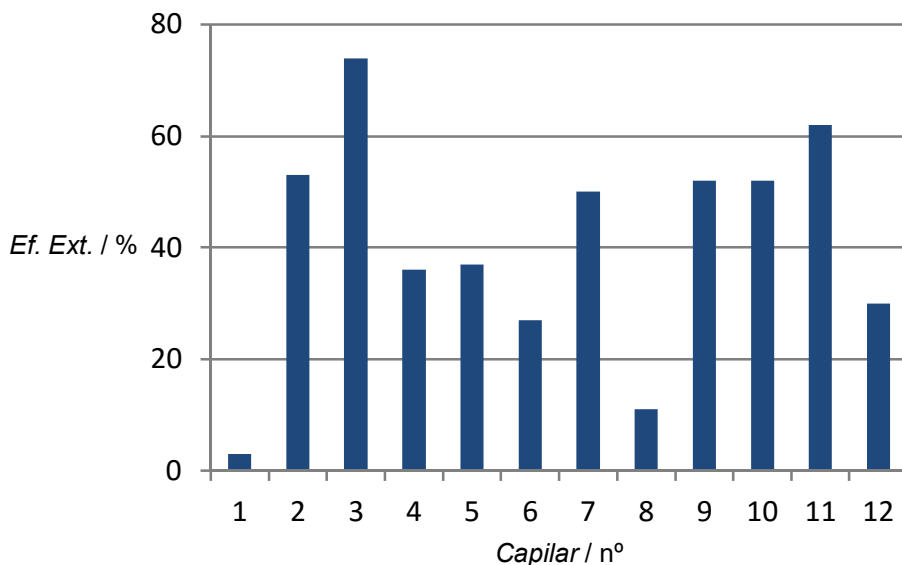


Figura 46. Eficiencias de extracción (Ef. Ext.) para las 12 columnas capilares ensayadas en la IT-SPME-nano-LC.

El hecho de que la IT-SPME-nano-LC aumenta la eficiencia de extracción del diclofenaco en comparación con la IT-SPME acoplada a HPLC o Cap-LC utilizando fases adsorbentes existentes (valores habituales entre 10 y 30%) [71] es debido principalmente a las condiciones hidrodinámicas particulares proporcionadas por la configuración del sistema nano-LC. El uso de nanoflujos y bajas cantidades de disolvente minimizan tanto la dilución de la muestra inyectada en el sistema como el movimiento hidrodinámico a través del capilar, permitiendo una mejor adsorción de los analitos. Adicionalmente, se verificó que todos los nanomateriales sintetizados tienen una mayor capacidad adsorbente que las fases poliméricas comerciales.

4.8 Selección de la columna capilar para el método desarrollado

El próximo paso fue escoger la mejor columna capilar para estudios posteriores. Se seleccionó el capilar 7 porque, aunque no proporcionó la eficiencia de extracción más alta para el diclofenaco comparado a otras columnas (50%, ver **Figura 46**), reduce considerablemente el tiempo de análisis (tiempo de retención de 11 min) permitiendo el uso de flujos mayores sin generar sobrepresiones en el sistema. Además, los perfiles de pico resultantes fueron mejores: bien definidos, más estrechos y altos (ver **Figura 45 a**). En cuanto a la IT-SPME-nano-LC utilizando el capilar 7, los LOD y LOQ fueron calculados como la concentración de analito que proporciona una razón señal-ruido de 3 y 10

respectivamente. El valor obtenido para el LOD fue de 1.0 ng/mL; en tanto que para el LOQ, 3.3 ng/mL. La precisión se evaluó intradía (n=5), consiguiéndose una desviación estándar relativa (RSD) del 4%.

Adicionalmente, se procesaron blancos sucesivos después de inyectar patrones de diclofenaco, confirmándose la ausencia de contaminación cruzada de muestras (la reproducibilidad no se vio alterada en ningún momento). El diclofenaco no fue detectado en ningún blanco.

Por otro lado, el número de veces que el capilar pudo ser empleado sin perder su capacidad de adsorción fue estimado en más de 100 veces (en todos los experimentos, el capilar no fue cambiado).

4.9 Análisis de muestras de agua y Voltarén

Como una aplicación del método, muestras de agua y Voltarén (conteniendo 50 mg de diclofenaco) fueron analizadas. Como se ha dicho, este analito se utiliza ampliamente y ha sido puesto en la lista prioritaria de vigilancia de ECs en el contexto de política de aguas por el Parlamento Europeo y el Consejo debido a su producción masiva y riesgos potenciales [29].

Todas las muestras de agua de diferentes ríos de la Comunidad Valenciana se procesaron directamente en el sistema, después de ser centrifugadas. Los resultados obtenidos indicaron un contenido inferior al LOD.

Para preparar la muestra de Voltarén, una tableta se trituró y se diluyó convenientemente en agua (acidificada a pH = 3.8 con HCl 1M) considerando el rango de trabajo del método (0-400 ng/mL). Utilizando el capilar 7 y su tiempo de transferencia óptimo determinado (15 s), el tiempo de retención para el diclofenaco fue de 10.5 min. Los cromatogramas (n=2) se pueden ver en la **Figura 47**. La concentración estimada de diclofenaco empleando la curva de calibrado obtenida para el capilar 7 (ver **Tabla 26**) fue de 55 ± 3 mg por tableta (RSD de 4%).

Muestras fortificadas fueron analizadas en ambas matrices y la recuperación obtenida fue de un $100 \pm 10\%$. No se detectó efecto matriz

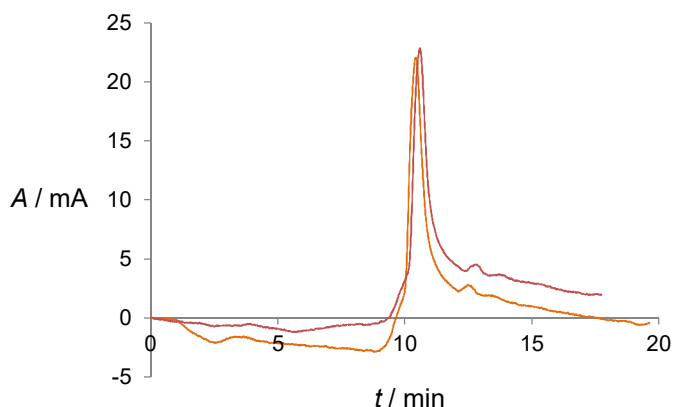


Figura 47. Cromatogramas de la IT-SPME-nano-LC utilizando el capilar 7 como columna capilar de muestras farmacéuticas convenientemente diluidas (Voltarén, $n=2$).

4.10 IT-SPME-nano-LC vs IT-SPME-Cap-LC

El método optimizado se comparó a la IT-SPME acoplada a Cap-LC utilizando un capilar funcionalizado con la misma fase adsorbente que la columna capilar seleccionada para el primero (capilar 7). Ambas metodologías contaban con un DAD para la detección. En la **Tabla 28** se contrastan diferentes parámetros operativos para ambas metodologías. La bomba capilar utilizada en la IT-SPME-Cap-LC-DAD fue programada en modo gradiente: fase móvil MeCN:agua 70:30 (v/v) por los 4 primeros minutos, a continuación se cambia a 50:50 (v/v) al min 5 y se mantiene constante durante 10 min a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. La ecuación de calibración para este método tuvo una pendiente de $8.8 \pm 0.3 \text{ mL}/\text{ng}$ y R^2 de 0.9987. Teniendo en cuenta que, en la IT-SPME-Cap-LC, el volumen procesado de patrón de diclofenaco fue de 200 μL (volumen óptimo para el cual no ocurre auto-elución del analito y las señales fueron más intensas [71]) y el volumen interno del capilar era 2.43 μL (contra los 0.94 μL para la IT-SPME-nano-LC, ver **Tabla 25**), los resultados son comparables (las pendientes de calibrado varían de manera casi proporcional con los volúmenes internos de los capilares). El LOD para la metodología IT-SPME-Cap-LC fue estimado en 1 ng/mL (inyectando diluciones sucesivas de patrón de diclofenaco hasta que la señal no se pudiese distinguir claramente del ruido de fondo) que es el mismo valor obtenido por el método IT-SPME-nano-LC (lo mismo sucedió con el LOQ). En un trabajo previo, un LOD de 1.7 ng/mL fue establecido.

Tabla 28. Comparativa entre diferentes parámetros de la IT-SPME-nano-LC-DAD (capilar 7) e IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Parámetro	IT-SPME-nano-LC	IT-SPME-Cap-LC
Volumen procesado (μL)	Loop lleno : 0.94 ó 5.64 ^a	200
pH de la muestra	3.8	3.8
Volumen interno del capilar (μL)	0.94	2.43
Flujo de la bomba capilar (μL/min)	^b 50	10
Fase móvil (MeCN:H ₂ O)	^b 10:90	Gradiente
Flujo de la nanobomba (μL/min)	0.2	-
Fase móvil (MeCN:H ₂ O)	50:50	-

^a6x(0.94), ^bpara transferir la muestra a la válvula 2

No obstante, existe una diferencia a parte del menor consumo de disolventes y volumen de muestra que prueba que la IT-SPME-nano-LC proporciona mejores resultados que la IT-SPME-Cap-LC: una eficiencia de extracción más elevada. Para la IT-SPME-Cap-LC, un 36% de eficiencia de extracción (calculado como se hizo en trabajos anteriores [71,82,256]) se obtuvo y es claramente más bajo que el valor obtenido por el capilar 7 (ver **Figura 46**). Esto comprueba lo anteriormente afirmado: el nuevo acoplamiento IT-SPME-nano-LC propuesto mejora la extracción de los analitos.

4.11 Preconcentración en IT-SPME-nano-LC

Para estimar la preconcentración en el sistema, se realizó el siguiente estudio cambiando el procedimiento de procesado de las muestras o patrones (para este estudio, se utilizó un patrón de 100 ng/mL): las dos válvulas se pusieron en posición de “carga”. El loop PEEK se llenó, la válvula 1 se cambió a posición de “inyección” y la bomba capilar se encendió. Después de 15 s (tiempo de transferencia del capilar 7), dicha bomba se apagó y la válvula 1 fue puesta nuevamente en posición de “carga”. El loop PEEK se llenó una segunda vez y se repitió el proceso completo (hasta 5 veces más). Finalmente, cuando la bomba capilar se apagó, la válvula 2 se puso en posición de “inyección” con lo que la nanobomba (que estaba encendida durante todo el proceso) impulsó la transferencia del patrón hasta la columna analítica. El proceso está completamente automatizado y como muestra la **Figura 48 a** la preconcentración del analito ocurrió efectivamente.

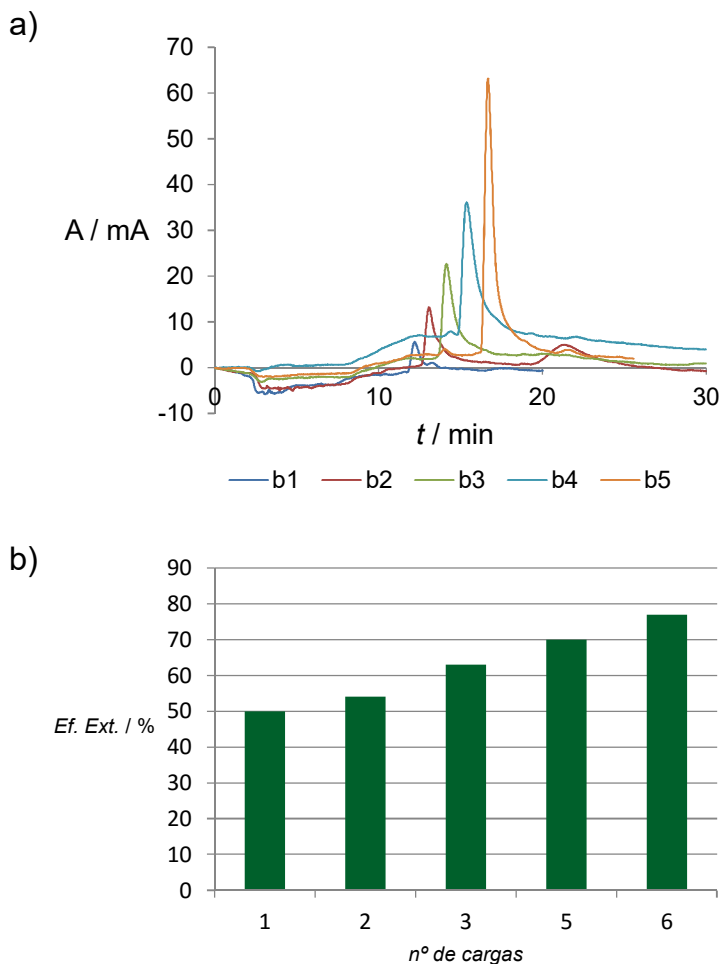


Figura 48. Estudios de preconcentración. a) Cromatogramas para la IT-SPME-nano-LC utilizando el capilar 7 como columna capilar de un patrón de diclofenaco de 100 ng/mL variando el número de veces que se llenó el loop PEEK de la válvula 1 (n° de cargas) en cada análisis: 1 (b1), 2 (b2), 3 (b3), 5 (b4) y 6 (b5) veces. b) Representación de la eficiencia de extracción (Ef. Ext.) vs n° de cargas para el capilar 7.

El loop PEEK posee un volumen interno de 8 μL . Esta cantidad fue transferida al capilar 7 que, a su vez, posee un volumen interno menor (0.94 μL). Por consiguiente, el hecho que la señal analítica se incremente proporcionalmente con el n° de veces en que el loop PEEK se haya recargado es clara evidencia de que el nanomaterial adsorbe eficientemente a los analitos. Si no hubiese habido retención efectiva, la señal no se

incrementaría lo que significaría que un nuevo volumen procedente del loop PEEK sólo desplazaría los 0.94 μL de disolución que contuviera el capilar de la transferencia anterior. Después de elucidar este efecto, el paso siguiente consistió en evaluar la preconcentración de los analitos a través del cálculo de la eficiencia de extracción en cada análisis (cada uno con un n° diferente de cargas). Si este parámetro aumenta con el n° de cargas significaría que pasar más volumen de muestra promueve una retención de un mayor número de moléculas de diclofenaco en cada recarga. Una representación de la eficiencia de extracción vs n° de cargas para el capilar 7 se aprecia en la **Figura 48 b**. El incremento de la eficiencia de extracción fue casi lineal ($R^2 = 0.984$). Este resultado es muy importante ya que prueba que con sólo cargar más veces el loop de inyección se puede mejorar la extracción del diclofenaco en el presente método IT-SPME-nano-LC. Con 6 cargas, cerca de un 80% del diclofenaco se extrae, un valor muy alto considerando que la técnica IT-SPME es utilizada.

4.12 Conclusiones

En el presente trabajo, se estudiaron fases adsorbentes basadas en nanomateriales para la IT-SPME con el objetivo de mejorar la eficiencia de extracción de los analitos. Estos adsorbentes se inmovilizaron en columnas capilares que se acoplaron en línea a un sistema nanocromatográfico. Este acoplamiento innovador se logró conectando dos válvulas (una convencional y otra micro-automática) cada una con su propia bomba. La configuración del sistema consigue exitosamente combinar flujo de inyección capilar con nanocromatografía a pesar de la diferencia de dimensión de las conexiones.

Además de obtener buenos parámetros analíticos (notablemente de sensibilidad, linealidad y precisión), excelentes resultados en materia de eficiencia de extracción (vista como el inconveniente de la técnica de IT-SPME) del compuesto estudiado se consiguieron. Este incremento en la eficiencia se debe a la alta capacidad adsorbente de las fases extractivas basadas en nanomateriales, la preconcentración en el sistema y las condiciones hidrodinámicas particulares que proporciona la nanocromatografía líquida. De entre los adsorbentes ensayados en la IT-SPME, una columna capilar basada en NPs de Fe_3O_4 esféricas en matriz de SiO_2/PEG fue seleccionada teniendo en cuenta un compromiso entre eficiencia y coste efectivo. Recargando el loop 6 veces mejoró la eficiencia de extracción desde un 50 a un 80%. También, la preconcentración efectiva es promovida por la transferencia automatizada y controlada en tiempo de la muestra desde la válvula de inyección a la columna capilar.

Por otra parte, en la IT-SPME-nano-LC, la muestra inyectada no sufre una dilución significativa en el sistema, así como también bajos volúmenes de disolventes y nanoflujos son empleados lo que permite una mejor adsorción de los analitos en la fase extractiva del capilar. Adicionalmente, el método propuesto fue aplicado en la determinación de diclofenaco en muestras ambientales y farmacéuticas (con recuperaciones cuantitativas).

De acuerdo con los resultados globales para el método IT-SPME-nano-LC-DAD desarrollado, el sistema propuesto (tal cual, sin hacer uso del magnetismo por ejemplo) tiene el potencial de convertirse en una poderosa herramienta, miniaturizada y amistosa con el medio ambiente, para el análisis traza de ECs.

Capítulo 5.

OPs y triazinas en aguas

5.1 Adsorbentes magnéticos en técnicas analíticas (antecedentes)

Como se ha visto hasta el momento, en el presente existe una línea de investigación dedicada al desarrollo de nuevas fases adsorbentes (e.g. nanomateriales) para mejorar la eficiencia de extracción de los contaminantes en general [265,266]. En el Capítulo 4, se ensayaron diversos materiales que involucraban nanoestructuras, NPs y polímeros para el análisis de diclofenaco fundamentalmente en aguas. De entre ellos, se seleccionó un nanomaterial basado en NPs de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG como relleno de capilar para un método de IT-SPME-nano-LC-DAD (la **Figura 49** muestra una imagen de TEM de las NPs en cuestión). Sin embargo, no se aprovecharon las propiedades magnéticas de este adsorbente ya que en la propia configuración del sistema propuesto, la eficiencia de extracción alcanzada fue de un satisfactorio 80%. En el estudio de pesticidas en aguas, se empleará el magnetismo para mejorar una metodología que involucra la IT-SPME y la Cap-LC-DAD, desarrollando un método basado en lo que se conoce como la IT-SPME magnética [71,81] acoplada a LC miniaturizada.

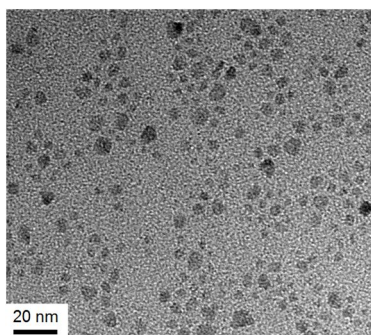


Figura 49. Imagen obtenida por TEM de NPs de Fe_3O_4 .

El fenómeno del magnetismo y su aplicabilidad en el campo de la química analítica han despertado el interés del mundo científico. Las interacciones magnéticas permiten controlar el movimiento de fluidos en microsistemas y, al mismo tiempo, ofrecen ventajas en cuanto a que no dependen de variables químicas como el pH, la concentración y las cargas superficiales [267]. Por consiguiente, el magnetismo es potencialmente una poderosa herramienta para técnicas de separación y de tratamiento de muestra, así como para sistemas que trabajen con microflujos. En definitiva, el desarrollo de nanomateriales magnéticos se ha convertido en una de las tendencias más atractivas en el marco de la investigación.

Como ya se comentó en la Introducción, los nanomateriales son cada vez más utilizados en la síntesis de fases adsorbentes consiguiendo mejorar la extracción de diversos compuestos en muestras ambientales, biológicas y clínicas. De entre ellos, los de naturaleza magnética se estudian en campos tales como la medicina [268], la química [269], las ciencias de los materiales [270] y del medio ambiente [271]. En química, su uso está enfocado mayoritariamente en procedimientos de tratamiento de muestras, sobre todo en la modalidad fuera de línea, desarrollándose técnicas como la microextracción en fase sólida magnética (MSPME) y la MSPE (variantes magnéticas de la SPME y la SPE) [82,272-276].

El nanomaterial magnético (siendo más preciso, superparamagnético), cuya síntesis se explica en la sección 3.4.1 de la Metodología Experimental y que fuera utilizado como relleno de la columna capilar finalmente escogida para la determinación de diclofenaco, será empleado en dos procedimientos magnéticos: la MSPE acoplada a IT-SPME-Cap-LC y la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC para analizar pesticidas. Esta última se ha aplicado con éxito en compuestos farmacéuticos [71], que al igual que los pesticidas estudiados (OPs y triazinas) son especies diamagnéticas que, como se verá, pueden extraerse con mayor facilidad al aplicarse un campo magnético externo.

5.2 Superparamagnetismo

Es pertinente definir el concepto de superparamagnetismo ya que es la propiedad del nanomaterial empleado (específicamente de las NPs de Fe_3O_4) que será aprovechada en este estudio. Es un fenómeno característico de ciertos materiales magnéticos, en los cuales y aplicado al caso estudiado, en el interior de una nanopartícula (es decir, a escala nanoscópica) existen interacciones ferromagnéticas intensas (i.e. un grado de magnetización elevado) que permiten lograr un ordenamiento magnético; sin embargo, la interacción entre las partículas son débiles y por lo tanto, dicho ordenamiento no se propaga a lo largo del sistema. En consecuencia, se generan regiones con diferentes gradientes magnéticos [71].

Por otro lado, si las NPs son lo suficientemente pequeñas la magnetización puede cambiar de forma aleatoria debido a la temperatura. En otras palabras, la energía necesaria para cambiar la dirección del momento magnético de la partícula es del orden de la energía térmica. El tiempo de relajación de Néel da cuenta del promedio que tarda en producirse este cambio. En ausencia de campo magnético, la magnetización media de la partícula es cero, debido a que la relajación antes mencionada es el fenómeno más rápido. A esto se le denomina el estado paramagnético. Al introducir un campo magnético, las partículas se magnetizan como lo haría un material paramagnético, pero con una magnitud mayor (la susceptibilidad magnética es más elevada) [277].

El superparamagnetismo comparte aspectos con el ferromagnetismo y el paramagnetismo. Como se mencionó previamente, una sustancia superparamagnética se

comporta como un compuesto paramagnético, pero posee una magnetización mayor. Por otra parte, puede alcanzar los mismos niveles de imantación que un material ferromagnético y presentar histéresis (i.e. la tendencia de un material a seguir magnetizado tras haber retirado el campo magnético), eso sí sólo por encima de ciertas frecuencias críticas.

En la **Figura 50** se representan las curvas de magnetización (M) versus campo magnético aplicado (B) para sustancias superparamagnéticas, ferromagnéticas y paramagnéticas. En las ordenadas, la curva del ferromagnetismo y la del superparamagnetismo alcanzan el mismo nivel (misma imantación máxima). El perfil del superparamagnetismo es sigmoideo al igual que el del paramagnetismo.

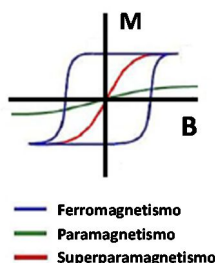


Figura 50. Curvas magnetización (M) vs campo magnético aplicado (B). Comparación de los diferentes comportamientos magnéticos.

Siendo el adsorbente utilizado un material superparamagnético, aplicando un campo magnético externo al sistema, dicho adsorbente responderá rápidamente y con ello, además de que los analitos son compuestos diamagnéticos, se puede incidir en la retención de estos últimos en esta fase extractiva bajo un mecanismo que se explicará posteriormente.

5.3 Caracterización del nanomaterial magnético y de los analitos

Se realizó una caracterización magnética del material utilizado por medio de un magnetómetro MSMS Squid (Quantum Design) de temperatura variable. A partir de expresiones matemáticas correspondientes se demostró que no existían interacciones dipolo-dipolo importantes entre NPs, es decir, que están aisladas (i.e. obtención experimental del tiempo de relajación de Néel que se corresponde al de partículas no interaccionantes). Este hecho se corresponde con lo reportado en la bibliografía [277], por lo que se puede afirmar que en el material existen NPs superparamagnéticas y que no interaccionan entre ellas. Este material puede ser fácilmente magnetizado con un campo magnético externo.

Tabla 29. Susceptibilidad magnética total (χ) para los analitos estudiados.

Analito	χ (adimensional)
Clorfenvinfos	-37.9
Clorpirifos	-36.8
Simazina	-24.9
Atrazina	-27.5
TBA	-29.9

En cuanto a los analitos se refiere, se calculó la susceptibilidad magnética (χ) para los 5 analitos estudiados (clorfenvinfos, clorpirifos, atrazina, simazina y TBA). Esta cantidad corresponde al grado de magnetización en respuesta a un campo magnético por parte de una sustancia. Los valores fueron negativos (como se espera en compuestos diamagnéticos) y similares en magnitud (los resultados se pueden ver en la **Tabla 29**).

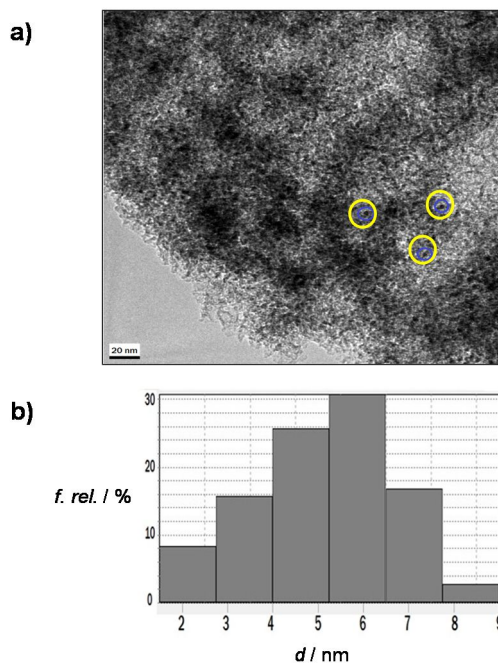


Figura 51. Caracterización del nanomaterial de $Fe_3O_4-SiO_2$. a) Imagen de HRTEM. Las NPs de Fe_3O_4 están marcadas en amarillo. b) Histograma de la distribución de tamaños de las NPs (“f. rel.”: frecuencia relativa).

De haber diferencias relativas a la adsorción en el material por parte de cada analito, éstas no pueden ser explicadas por los valores de χ , sino por la polaridad de cada compuesto y las condiciones cromatográficas (en ambas familias de pesticidas).

Adicionalmente, el nanomaterial de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ (de nombre extendido, nanomaterial basado en NPs de Fe_3O_4 en matriz de SiO_2/PEG) fue caracterizado por HRTEM. En la **Figura 51**, se pueden observar tanto una imagen de HRTEM del nanomaterial en cuestión como también un histograma de la distribución de los tamaños de las NPs de Fe_3O_4 que lo constituyen. Los núcleos metálicos se distinguen en el material adsorbente y el diámetro promedio de las NPs fue de 5.10 nm. Para mayor información, consultar los Anexos 2 y 4.

5.4 MSPE. Capacidad adsorbente del nanomaterial.

Se estudió la aplicabilidad del nanomaterial como fase adsorbente en procesos de extracción fuera de línea, en concreto, la MSPE (el adsorbente posee NPs magnéticas) como etapa de pretratamiento de muestra para la determinación de OPs. En el Capítulo 4, se demostró que este nanomaterial es un buen adsorbente para el diclofenaco y que aumentaba sustancialmente la eficiencia de extracción de los analitos sin hacer uso de campos magnéticos. No obstante, realizar una extracción fuera de línea tiene como utilidad adicional que se puede emplear (de obtener resultados favorables) como método de remediación (i.e. remoción de la contaminación) de la matriz en cuestión (en este caso, aguas) para el tratamiento de la misma en determinada situación.

Utilizando el procedimiento de MSPE y los parámetros operativos del mismo descritos en las secciones 3.3.1.1 y 3.5 de la Metodología Experimental respectivamente, se realizaron estudios en muestras de agua fortificadas con 3 y 4 $\mu\text{g/L}$ de clorfenvinfos y clorpirifos respectivamente. Por una parte, éstas se inyectaron directamente en un sistema IT-SPME-Cap-LC; por otra, luego de realizar la MSPE, el sobrenadante (separado del nanomaterial con ayuda del imán de Nd) se procesó también por IT-SPME-Cap-LC-DAD. La detección se realiza a 230 nm (como en todo este capítulo). Para la identificación de los analitos, se registran los espectros entre 190-400 nm. Los cromatogramas resultantes se presentan en la **Figura 52**. Como puede observarse, se produce la adsorción cuantitativa de los analitos. Esto significa que el nanomaterial de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ puede ser empleado en procesos de remediación en muestras medioambientales.

Por otra parte, patrones de 10 $\mu\text{g/L}$ de clorfenvinfos y de clorpirifos se procesaron por MSPE (esta vez no se trabajó con el sobrenadante, sino con el extracto final luego de extraer los analitos del nanomaterial). En la **Figura 53**, se muestra el cromatograma obtenido en que se identifican los picos de ambos analitos.

A continuación se procedió a realizar la calibración del método MSPE-IT-SPME-Cap-LC y la obtención de los parámetros analíticos (curvas de calibrado, LODs y precisión). El LOD se evaluó experimentalmente como la concentración de analito que proporcionaba una señal 3 veces superior a la del ruido de fondo. La precisión (como RSD) se evaluó intra e interdía.

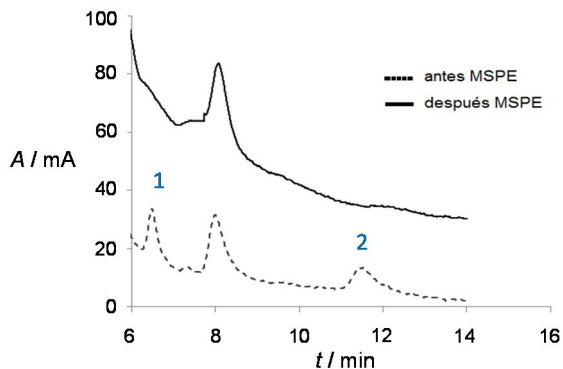


Figura 52. Cromatogramas de una muestra fortificada antes y después (sobrenadante procesado) de realizar la MSPE. (1) Clorfenvinfos. (2) Clorpirifos.

Los parámetros analíticos se pueden ver en la **Tabla 30**. Buenos valores para la linealidad (R^2), los LODs y la precisión fueron obtenidos. Dos parámetros adicionales fueron calculados: los porcentajes de recuperación y remediación.

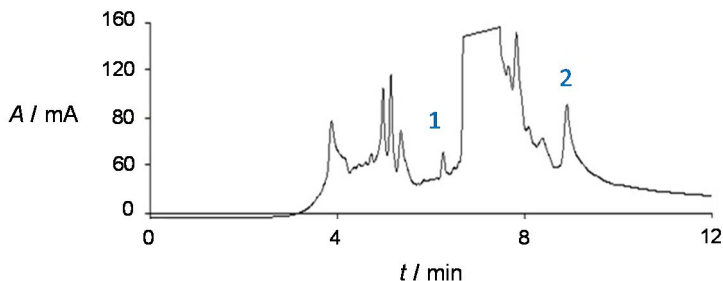


Figura 53. Cromatograma de un patrón de 10 µg/L de (1) clorfenvinfos y (2) clorpirifos procesado por MSPE-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Tabla 30. *Parámetros analíticos para la MSPE-IT-SPME-Cap-LC.*

	$y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) \cdot x$			LOD (ngL ⁻¹)	RSD (%)	
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ (μgL ⁻¹)	R^2		Intradía (n=3)	Interdía (n=6)
Clorfenvinfos	7±2	4.9±0.2	0.993	100	5	10
Clorpirifos	-2±10	25±1	0.991	50	7	13

El porcentaje de recuperación se obtuvo de la manera convencional: utilizando la recta de calibrado se calcularon las concentraciones obtenidas de los extractos finales luego de realizar la MPSE para una muestra fortificada, una muestra y un patrón de concentración equivalente a dicha fortificación. Haciendo la razón (porcentual) de concentraciones entre la relativa a la muestra fortificada menos la de la muestra y la del patrón, se estimó el porcentaje de recuperación.

Para el cálculo del porcentaje de remediación se procesaron una muestra fortificada y una muestra por MSPE, pero se inyectaron los sobrenadantes. Se calculó la concentración mediante la recta de calibrado para ambos casos, restándose al valor obtenido para la muestra fortificada el de la muestra sin fortificar. Finalmente, se estimó la razón (porcentual) entre el último valor calculado y la concentración obtenida para un patrón directamente procesado por IT-SPME-Cap-LC.

Esta cantidad se le restó a 100% para calcular el porcentaje de remediación. Este porcentaje puede ser concebido como la capacidad de adsorber o extraer los analitos por parte del nanomaterial.

En la **Tabla 31** se pueden apreciar los valores de porcentaje tanto para la recuperación como para la remediación. Ambos valores son cercanos al 100% para los dos analitos, lo que significa que la exactitud del método es adecuada (no hay efecto matriz) y que el nanomaterial es un buen adsorbente de estos compuestos (para triazinas, este hecho se verificará directamente aplicando la Magnetic-IT-SPME).

Tabla 31. *Recuperación y remediación en el método MSPE-IT-SPME-Cap-LC-DAD.*

	Recuperación (%)	Remediación (%)
Clorfenvinfos	92±4	95±5
Clorpirifos	97±3	100±6

5.5 Magnetic-IT-SPME

La configuración del sistema para lograr la Magnetic-IT-SPME acoplada a Cap-LC-DAD está discutida en la sección 3.3.2.2 de la Metodología Experimental. En cuanto a las condiciones experimentales de la misma, éstas se pueden encontrar en la sección 3.5 de la Metodología Experimental (y en la **Tabla 22**). De los parámetros presentados en dicha sección, el volumen de inyección de OPs se optimizó para obtener la máxima señal en el sistema (nota: para triazinas, se seleccionó un volumen de inyección de 100 μL). Además, la columna capilar fue de un largo diferente dependiendo de los analitos estudiados: 60 y 15 cm para OPs y Triazinas respectivamente. Por su parte, la preparación del capilar magnético funcionalizado con el nanomaterial de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ se comentó en la sección 3.4.1 de la Metodología Experimental.

Primeramente, es importante discutir el modo de inyección en el sistema en cuestión: la muestra o patrón se inyectan en la válvula acoplada al capilar magnético que atraviesa a su vez una bobina magnética conectada a una fuente generadora (**Figura 35** de la sección 3.3.2.2 antes mencionada). Esta fuente generadora puede suministrar un campo magnético (B) entre 0 y 400 G, con posibilidad de (a B constante) cambiar la polaridad del mismo (por simplicidad, se referirá como polaridad hacia la derecha (\gg) y a la izquierda (\ll)).

5.5.1 Inyección en el sistema

Si se trabaja a $B = 0$ G, no se hace uso del magnetismo en el sistema y la técnica utilizada es análoga a la IT-SPME-Cap-LC-DAD empleando un adsorbente magnético (técnica empleada como método comparativo en el Capítulo 4). Si se trabaja a un B no nulo, antes de inyectar la muestra, se fija el campo en una cierta magnitud y polaridad (e.g. \gg). A continuación se inyecta la muestra o patrón (válvula en posición de “carga”) quedando los analitos retenidos en el capilar. Luego se gira la válvula (cambiando a posición de inyección), al mismo tiempo que se cambia la polaridad del campo (a \ll , la explicación del fenómeno involucrado será detallada posteriormente) y así los analitos son desorbidos.

En una etapa inicial, se optimizó el volumen de inyección para OPs en la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD. La **Figura 54** muestra la variación de la señal analítica en función del volumen procesado para un patrón de 5 $\mu\text{g/L}$ de clorfenvinfos y clorpirifos. A diferentes B , el perfil fue similar y a partir de 3 mL la señal comenzaba a decrecer. Por lo mismo, se seleccionó 3 mL como volumen de inyección para todos los experimentos posteriores.

El paso siguiente consistió en determinar a qué B se obtiene la señal más intensa tanto para OPs como para triazinas en sus respectivas condiciones de trabajo.

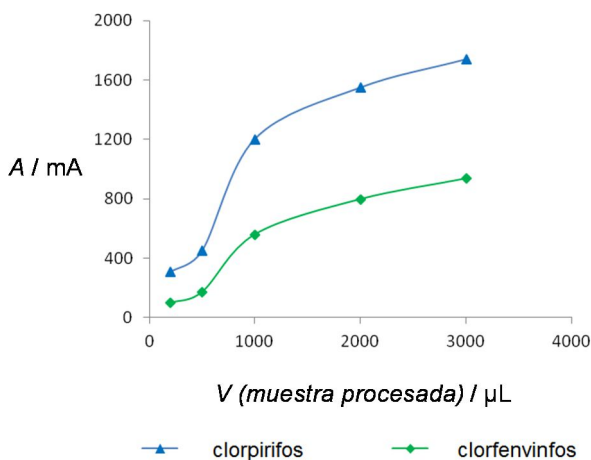


Figura 54. Estudio de la optimización del volumen de muestra a procesar para OPs en la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

5.5.2 Optimización de B

Para los próximos estudios, se calculará la eficiencia de extracción, calculada de manera particular para el diclofenaco en el Capítulo 4, por lo que es necesario definir como fue obtenida en este caso: se hizo la razón entre la señal obtenida para una masa de analito (concentración inyectada por volumen procesado) sometida a Magnetic-IT-SPME-Cap-LC (o IT-SPME-Cap-LC a $B = 0$ G) y la señal obtenida para la misma masa de analito por inyección directa (sin IT-SPME, con válvula de volumen fijo, $2 \mu\text{L}$). Sabiendo la señal que proporciona $2 \mu\text{L}$ (y por ende, la masa de analito, sabiendo la concentración inyectada), se estima por relación directa la señal que debería obtenerse por Magnetic-IT-SPME-Cap-LC (o en su variante no magnética) para una masa procesada con 100% de eficiencia de extracción. De obtener menos, se hace la razón (porcentual) y se obtiene este parámetro.

El efecto del campo magnético se evaluó ensayando diferentes valores de B para los 5 analitos estudiados (detección a 230 nm). En las **Figuras 55** y **56** se representan las variaciones de las eficiencias de extracción con respecto a B para OPs y triazinas respectivamente. Se aprecia como para el clorfenvinfos y el clorpirifos, la extracción fue máxima para $B = 200$ G; en cambio, para la simazina, atrazina y TBA, lo fue para $B = 150$ G. Las concentraciones de los patrones utilizados en esta experiencia fueron de 10 y $3 \mu\text{g/L}$ para clorfenvinfos y clorpirifos respectivamente (volumen de inyección de 3 mL), así como $30 \mu\text{g/L}$ para cada una de las triazinas analizadas (volumen de inyección $100 \mu\text{L}$).

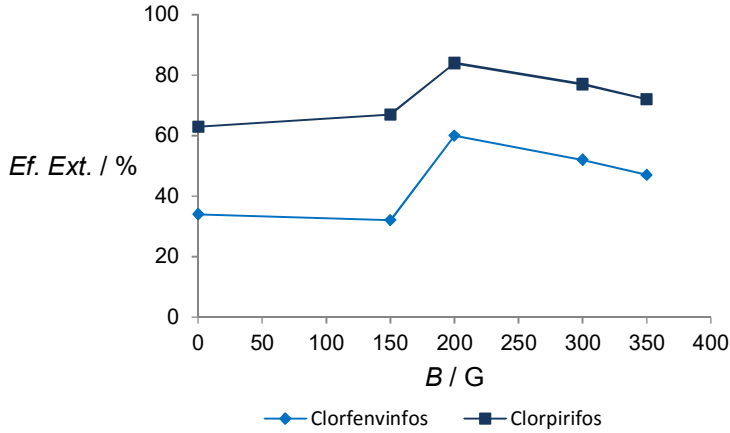


Figura 55. Influencia del campo magnético (B) en la extracción de OPs: 10 y 3 µg/L para clorfeninfos y clorpirifos respectivamente.

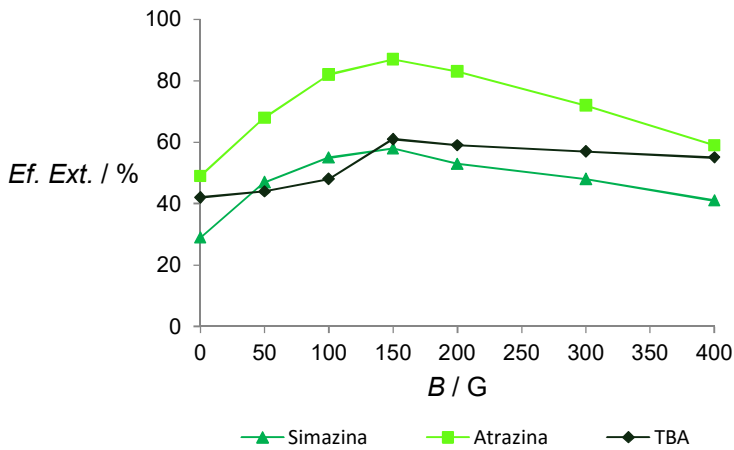


Figura 56. Influencia del campo magnético (B) en la extracción de triazinas: 30 µg/L de cada una.

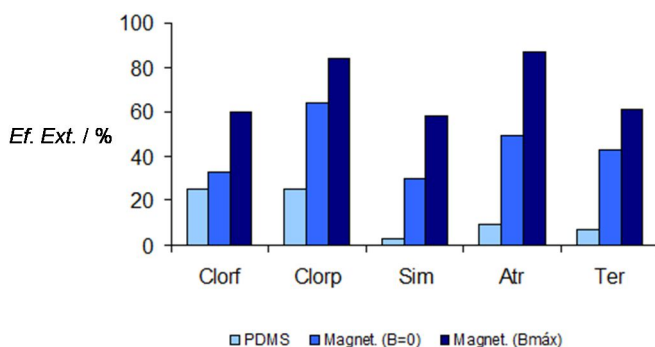
5.5.3 Comparativa de eficiencias de extracción

Se establecieron las eficiencias de extracción máximas para cada analito en el B óptimo, siendo estos porcentajes: a 200 G, 60% para clorfeninfos y 84% para clorpirifos; 58, 87 y

61% para simazina, atrazina y TBA a 150 G respectivamente. De la misma experiencia, se pueden obtener los valores a $B = 0$ G que correspondería a la eficiencia de extracción del nanomaterial debido a sus propiedades como adsorbente. Comparativamente, se utilizó la IT-SPME-Cap-LC-DAD con un capilar comercial de PDMS TRB-5 (detalles en la sección 3.5 de la Metodología Experimental) y se calcularon las correspondientes eficiencias de extracción. La **Tabla 32** recoge los valores obtenidos en este último caso contrastándolos con los obtenidos para el procedimiento propuesto a campo nulo. Se ve claramente como el adsorbente estudiado extrae de mejor forma los analitos que una fase comercial no funcionalizada.

Tabla 32. Eficiencias de extracción para los compuestos estudiados utilizando un capilar de PDMS TRB-5 y uno magnético sintetizado trabajando a $B = 0$ G.

	Eficiencia de Extracción (%)	
	capilar PDMS TRB 5%	capilar magnético B=0 G
Clorfenvinfos	25	33
Clorpirifos	29	64
Simazina	3	30
Atrazina	9	49
TBA	11	43



Clorf = clorfenvinfos; Clorp = clorpirifos; Sim = simazina; Atr = atrazina; Ter = TBA

Figura 57. Resumen comparativo de los métodos utilizados: uso de capilares comerciales de PDMS TRB-5 y magnéticos a $B = 0$ G y $B_{máx}$ (200 G para OPs y 150 G para triazinas).

La **Figura 57** muestra las eficiencias de extracción por analito bajo las tres aproximaciones empleadas: IT-SPME-Cap-LC, Magnetic-IT-SPME-Cap-LC a $B = 0$ G (análoga a la primera) y a B no nulo. El magnetismo incrementa los valores del parámetro en todos los casos alcanzando porcentajes por sobre el 80% para clorpirifos y atrazina (como se había visto).

5.5.4 Explicación del efecto de B sobre la eficiencia de extracción de los analitos

El incremento de las señales aplicando un campo magnético responde a un fenómeno físico-químico que ocurre dentro del capilar, hecho que se había evidenciado para otros OCs diamagnéticos [71]. Para simplificar, se ha dividido el proceso en 3 partes (cuyo esquema se representa en la **Figura 58 a**):

- Carga: los analitos diamagnéticos son inyectados (válvula en posición de carga) en un capilar magnético sometido a un B de intensidad y polaridad determinadas (e.g. \gg) en cuya superficie interna se encuentra la fase adsorbente (nanomaterial de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, la **Figura 58 b** muestra una imagen de SEM en donde se aprecia el interior del capilar magnético). Las NPs superparamagnéticas del material se han magnetizados creando zonas donde B es máximo y otras donde es mínimo.

- Adsorción: los analitos se adsorben en la matriz del nanomaterial adsorbente. Por otra parte, al ser compuestos diamagnéticos tenderán a ser retenidos con mayor fuerza en las zonas donde B es mínimo (efecto que se suma a la propia afinidad de estos compuestos por la fase extractiva). Este hecho aumenta la eficiencia de extracción de los analitos (que son inyectados en volúmenes superiores al del volumen interno del capilar).

- Desorción: la válvula se gira a posición de inyección por lo que la fase móvil empieza a pasar por el capilar desorbiendo progresivamente los analitos. Al mismo tiempo, se cambia la polaridad (\ll) lo que también provoca que las moléculas de analito sean desorbidas. En definitiva, la fase móvil arrastra todas las moléculas hacia el resto del sistema cromatográfico.

Por último, cabe mencionar que los compuestos analizados dentro de las dos familias estudiadas (OPs y triazinas) se separan completamente los unos de los otros en las condiciones seleccionadas (al campo magnético donde su señal fue máxima). Los cromatogramas de la **Figura 59** son una prueba de ello.

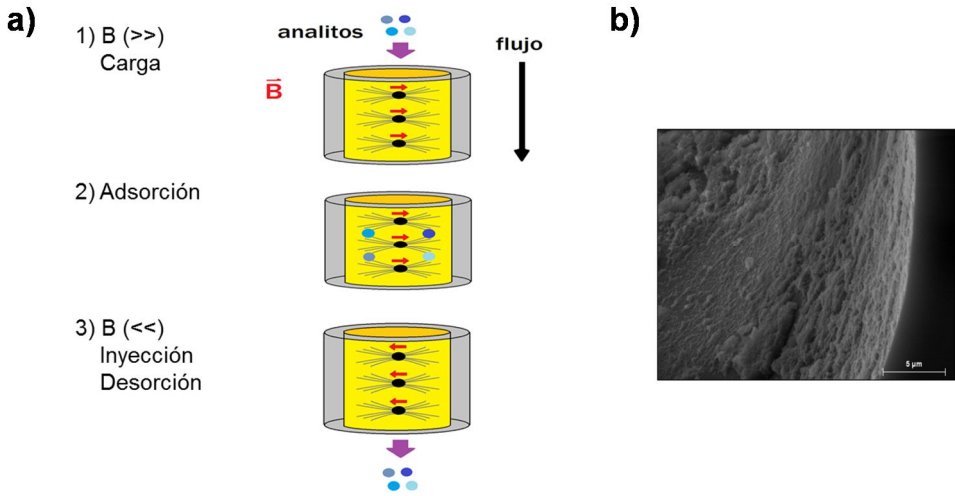


Figura 58. Magnetic-IT-SPME. a) Explicación por etapas de los fenómenos ocurridos dentro del capilar al momento de la inyección: 1) carga de los analitos en el sistema a B fijo (>>), 2) adsorción de los analitos en el adsorbente, 3) inyección-desorción de los analitos al resto del sistema a B fijo (<<). b) Imagen de SEM del interior del capilar magnético (escala 5 µm).

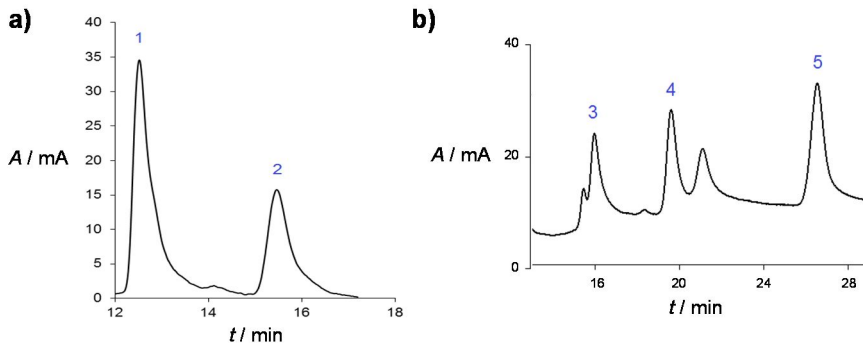


Figura 59. Cromatogramas para la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD de: a) 10 µg/L de (1) clorfeninfos y 2 µg/L de (2) clorpirifos a 200 G. b) 30 µg/L de (3) simazina, (4) atrazina y (5) TBA a 150 G.

5.6 Calibración del método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD. Parámetros analíticos.

Habiendo encontrado el B óptimo de trabajo para OPs (200 G) y triazinas (150 G) se procedió a realizar la calibración del método y la obtención de los parámetros analíticos respectivos en las condiciones mencionadas.

5.6.1 OPs

En la **Tabla 33** y **34** se muestran los resultados de calibración y los parámetros analíticos estimados respectivamente en la determinación de OPs. La linealidad fue excelente reflejada en el valor de R^2 y la precisión (intra e interdía) satisfactoria (valores de RSD no mayores al 15%) considerando los niveles de concentración implicados. En cuanto a sensibilidad, los LODs (del orden de las ppts o ng/L) son bastante inferiores a las CMAs (300 y 100 ng/L para clorfenvinfos y clorpirifos respectivamente) [13] y por lo tanto, el método desarrollado resulta ideal para la detección rutinaria de estos analitos. LODs y LOQs se calcularon como la concentración de analito que proporciona una razón señal-ruido de 3 y 10 respectivamente.

Tabla 33. Calibración del método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD para el análisis de OPs.

	$B_{\text{máx}}$ (G)	$y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) \cdot x$		
		$a \pm s_a$	$B \pm s_b$ (μgL^{-1})	R^2
Clorfenvinfos	200	3 ± 20	90 ± 4	0.995
Clorpirifos	200	82 ± 53	500 ± 7	0.9997

Tabla 34. Precisión (RSD), LODs y LOQs del método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD para el análisis de OPs.

	RSD (%)		LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
	Intradía (n=3)	Interdía (n=6)		
Clorfenvinfos	9	14	50	167
Clorpirifos	12	15	10	33

Si se compara la sensibilidad del método ensayado en secciones precedentes (MSPE-IT-SPME-Cap-LC-DAD) en donde los LODs también son inferiores a las CMAAs (ver **Tabla 30**), la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD consigue bajar estos límites. Teniendo en cuenta que la manipulación, el grado de automatización y el tiempo de análisis son menores comparados a los del método basado en la MSPE, la metodología propuesta que hace uso de la Magnetic-IT-SPME se perfila como una excelente herramienta para el control de pesticidas en aguas.

5.6.2 Triazinas

Habiendo obtenido muy buenos resultados para OPs, se estudiaron los parámetros analíticos para las triazinas. Este análisis fue una extensión en cuanto a aplicaciones del método en cuestión, por lo que se calcularon determinadas figuras de mérito para evaluar la viabilidad del método. Trabajando al B óptimo establecido (150 G), se calcularon los LODs y el RSD (intradía) para estimar la precisión. Los LODs, en esta oportunidad, se obtuvieron haciendo diluciones sucesivas de los patrones hasta el punto en que la señal conseguida fuese distinguible de la línea base (señal/ruido igual a 3).

En la **Tabla 35** se pueden observar los resultados. Los LODs establecidos son comparables a los obtenidos por otros métodos (SPE acoplado a HPLC o GC, entre otros [90]). No obstante, hay varios aspectos en los cuales se puede seguir trabajando para obtener mejores resultados: por ejemplo, procesar un mayor volumen de muestra (mayor a 100 μL) o alargar el sistema cromatográfico aumentando la longitud de la columna capilar magnética (mayor a 15 cm). Sin embargo, estos valores de LODs son inferiores a los límites legislados.

Tabla 35. Precisión y LODs en el método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD para el análisis de triazinas.

	$B_{\text{máx}}$ (G)	RSD (%) Intradía (n=3)	LOD ($\mu\text{g/L}$)
Simazina	150	10	0.4
Atrazina	150	9	0.3
Terbutilazina	150	7	0.3

El paso a seguir llegado a este punto, para OPs y triazinas es aplicar este método a muestras de aguas y cuantificar los analitos en cuestión. En caso de que las concentraciones sean inferiores a los LODs, se pueden realizar estudios de recuperación y evaluar si existe o no efecto matriz, así como la exactitud del método.

5.7 Aplicabilidad del método desarrollado

Se analizaron las muestras descritas en la sección 3.6 de la Metodología Experimental. Para OPs, todas las muestras de aguas residuales arrojaron valores por debajo de los LODs. De la misma forma, las triazinas no fueron detectadas en muestras de agua de río.

Se realizaron estudios de recuperación para evaluar el efecto matriz. Para ello, se inyectaron muestras fortificadas, muestras sin fortificar (i.e. blancos de muestra) y patrones de concentración igual a la fortificación. Se calculó el porcentaje de recuperación de la manera convencional como se explicó por ejemplo en la sección 5.4. Para los OPs, se fortificó con 3 y 4 $\mu\text{g/L}$ de patrón de clorfenvinfos y clorpirifos respectivamente; para triazinas, con patrones de 2.5 $\mu\text{g/L}$ para cada una. La **Tabla 36** presenta las recuperaciones obtenidas, siendo estas cercanas al 100% y por lo tanto, descartando el efecto matriz en todos los casos (la exactitud del método es adecuada).

Tabla 36. Resultados del estudio de recuperación en aguas para OPs y triazinas.

	Recuperación (%)
Clorfenvinfos	94 \pm 5
Clorpirifos	97 \pm 6
Triazinas	99 \pm 1/110 \pm 5

5.8 Conclusiones

La Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD ha demostrado ser un excelente método para cuantificar OPs (clorfenvinfos y clorpirifos) y triazinas (simazina, atrazina y TBA) en el análisis de aguas. Se trata de una técnica simple, rápida y en donde la manipulación del operario es baja ya que las etapas de pretratamiento de la muestra y de preconcentración están acopladas con el sistema de separación-detección.

En dicha técnica se emplean capilares magnéticos que poseen como relleno un nanomaterial de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ que contiene NPs superparamagnéticas y se ha probado, tanto por los resultados conseguidos con la metodología propuesta como por medio de la MSPE acoplada a IT-SPME-Cap-LC, que es un buen material adsorbente para los analitos diamagnéticos estudiados pudiendo ser utilizados para la remediación de aguas (en el caso de OPs y empleando la MSPE).

Habiendo comprobado la afinidad de los compuestos en estudio por el material adsorbente, se evaluó el efecto del campo magnético externo contrastando, en un estudio comparativo, la IT-SPME (empleo de capilares comerciales de PDMS) con la Magnetic IT-SPME acopladas ambas a cromatografía capilar, esta última en ausencia (análoga a la IT-SPME) y presencia de un campo magnético externo. Los mejores resultados se obtuvieron en la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC a 200 y 150 G para OPs y triazinas respectivamente. Cabe resaltar, que las características magnéticas por analito (medida de su susceptibilidad magnética) no permiten explicar los resultados obtenidos en cuanto a adsorción (se deben considerar la polaridad del compuesto y las condiciones cromatográficas específicas [71,267]).

Muestras de aguas (residuales y de río) de la Comunidad Valenciana fueron sometidas a la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC. Las concentraciones de todos los analitos estuvieron por debajo de los límites de detección del método. Los estudios de recuperación evidenciaron un buen valor para la exactitud y mostraron que no existe efecto matriz en la metodología desarrollada (valores porcentuales cercanos al 100%).

En resumidas cuentas, la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC se perfila como una poderosa herramienta de cuantificación e identificación de pesticidas en aguas, teniendo potencial para convertirse en un método indispensable tanto en la caracterización como en el seguimiento de estos compuestos y presumiblemente de otros OCs diamagnéticos (incluidos ECs) en diferentes tipos de muestras de aguas.

Capítulo 6.

AgNPs en matrices acuosas (Parte 1)

6.1 Principio del método UV-Vis propuesto

La mayoría de los métodos de síntesis de AgNPs utilizan AgNO_3 (i.e. plata como Ag^+) como reactivo de partida, es decir, que es la Ag^+ , la que después de distintas etapas, se transforma en AgNPs [239,240,247,248,250]. Por lo tanto, de no producirse una conversión cuantitativa del reactivo de partida, Ag^+ quedaría libre en el medio de síntesis y/o adsorbida a la superficie de las partículas. Es más, en determinadas circunstancias, las propias NPs pueden liberar Ag^+ [161-163] en procesos de desorción de iones quimisorbidos desde la superficie de las partículas o por un proceso menos frecuente de disolución oxidativa. Por otra lado y como se ha visto en la Introducción, una gran parte de los métodos de análisis de AgNPs necesita etapas de reconversión de éstas a Ag o Ag^+ (lo que se suma a los iones que no pertenecen a las NPs, acarreado errores de medición).

Por todo lo mencionado anteriormente, es de suma importancia controlar la cantidad de Ag^+ presente en una síntesis de AgNPs, lo que no sólo permite establecer el rendimiento de la misma, sino también monitorizar la evolución de las partículas en el tiempo o en un determinado entorno. Para ello se necesita un método “in situ” que permita determinar la Ag^+ en presencia de las AgNPs, sin alterar a estas últimas. A su vez, esta herramienta podría optimizar los procedimientos de síntesis establecidos o por establecer (e.g. cantidad de reductor necesaria para producir una conversión a NPs del 100%).

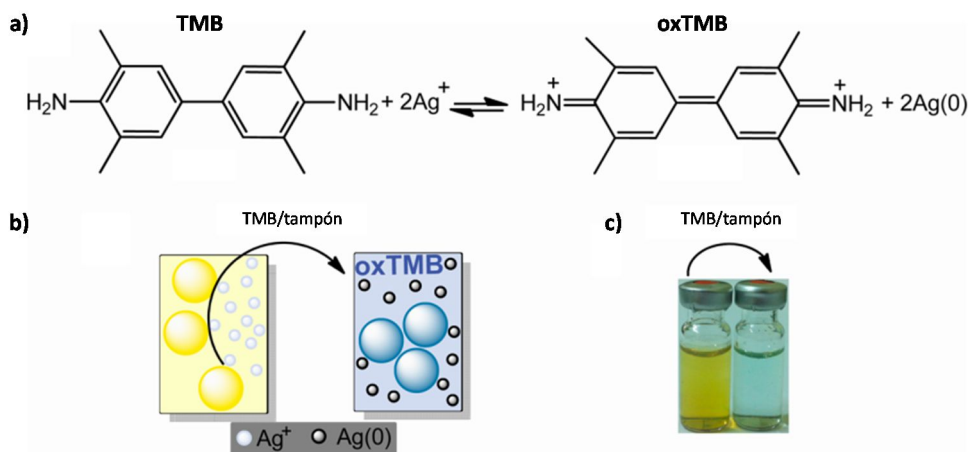


Figura 60. a) Oxidación de la TMB por Ag^+ . b) Representación esquemática de la detección “in situ” de Ag^+ residual después de una síntesis de AgNPs. c) Visualización colorimétrica “in situ” (en este caso, las NPs fueron fortificadas con 4 mg/L de Ag^+).

Recientemente, Liu y colaboradores utilizaron TMB como un indicador selectivo y sensible de Ag^+ [278]. La **Figura 60 a** muestra la reacción redox en donde al añadir TMB (preparado en EtOH) y una disolución tampón (AcNa/AcH, pH = 4) a una disolución incolora que contiene Ag^+ produce una forma oxidada de la TMB (oxTMB) y $\text{Ag}(0)$. Esta reacción se puede seguir por espectrofotometría UV-Vis (los picos de absorbancia para la oxTMB son a ~370 y 656 nm) y visualmente debido a la coloración azul que adquiere la disolución. Para más información, ver el Anexo 3.

En el presente estudio, se optimizó un método colorimétrico que hace uso de la TMB para la cuantificación “in situ” de Ag^+ en presencia de AgNPs (la **Figura 60 b** representa esquemáticamente el principio del método desarrollado). Como se comentó en la Introducción las AgNPs poseen como propiedad característica la SPRB (dispersiones de color amarillo, con un máximo de absorbancia alrededor de los 400 nm). Experimentalmente se observa por lo tanto un cambio de color de amarillo a azul si la síntesis contiene Ag^+ (como se puede ver en la **Figura 60 c**).

6.2 Procedimiento de derivatización y medida espectrofotométrica

El procedimiento propuesto fue el siguiente: 1.2 mL de disolución patrón de Ag^+ , AgNPs o AgNPs fortificadas con Ag^+ se mezclaron con 100 μL de TMB (en EtOH) y 200 μL de tampón AcNa/AcH (1 M, pH = 4). Después de un cierto tiempo de reacción, las disoluciones (o dispersiones en caso de contener NPs) fueron medidas en un espectrofotómetro. La longitud de onda en el máximo de absorbancia para oxTMB corresponde a 656 nm. Se realizó la optimización de la concentración de TMB y el tiempo de reacción. Alícuotas de las síntesis fotoquímicas (síntesis F) [247], térmicas con citrato [248] o con NaBH_4 [250] como reductor (síntesis TC y TN respectivamente) bajo estas condiciones fueron procesadas con la metodología propuesta. Las síntesis térmicas fueron diluidas a la mitad antes de ser procesadas.

6.3 Síntesis de AgNPs analizadas, SPRB y caracterización por TEM

La **Tabla 37** muestra todas las síntesis empleadas a lo largo de este estudio, producidas bajo los métodos mencionados en el apartado anterior [247,248,250] descritos en la sección 3.4.3 de la Metodología Experimental.

Los métodos fotoquímicos [247,279] producen la generación “in situ” de un agente reductor (un radical) de Ag^+ a temperatura ambiente, ofreciendo la ventaja de evitar altas temperaturas [280]. Además, éstos previenen el uso de altas concentraciones de sustancias potencialmente peligrosas y extensos tiempos de reacción. Entonces, se obtuvieron dispersiones acuosas de AgNPs por irradiación UVA del I-2959 (el fotoiniciador) en

presencia de AgNO_3 y citrato trisódico en 5 minutos. Con estas síntesis (e.g. F1A) se realizaron los estudios preliminares.

Tabla 37. Estrategias sintéticas utilizadas para obtener AgNPs.

Estrategia	T (°C)	Reactivo(s)	t (min)	Síntesis
Fotoquímica Lámpara UVA	Tamb ^a	citrato/I-2959	5	F1A/B/C
			10	F2
			15	F3
			20	F4
Térmica (1)	70	NaBH ₄ (0.1%)	5	TN1
			10	TN2
			15	TN3
			60	TN4
			NaBH ₄ (0.04%)	60
Térmica (2)	95	citrato/glicerol	60	TCA/B

^aTemperatura ambiente

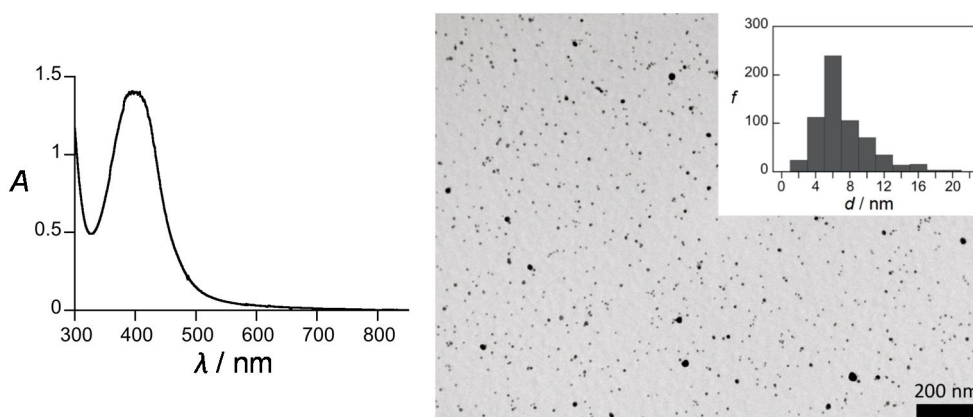


Figura 61. Síntesis F3 preparada usando I-2959 como fotoiniciador y citrato como agente estabilizante, irradiación UVA durante 15 min. (izquierda) Espectro de absorción. (derecha) Imagen de TEM e histograma con la distribución de partículas.

Los espectros de absorción que muestran la SPRB así como imágenes e histogramas obtenidos por TEM para la síntesis fotoquímica producida en 15 minutos (F3) y para las

síntesis térmicas (TCA y TN4) se pueden apreciar en las **Figuras 61, 62 y 63** (“f” es frecuencia, i.e. el número de partículas contadas).

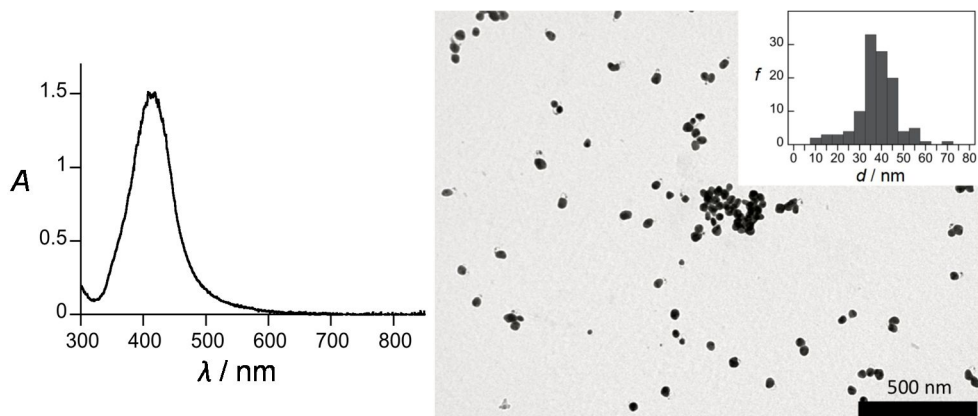


Figura 62. Síntesis TCA preparada térmicamente calentando una mezcla de glicerol-agua (40% (v/v) de glicerol) en presencia de citrato a 95°C. (izquierda) Espectro de absorción (dilución 2:15). (derecha) Imagen de TEM e histograma con la distribución de partículas.

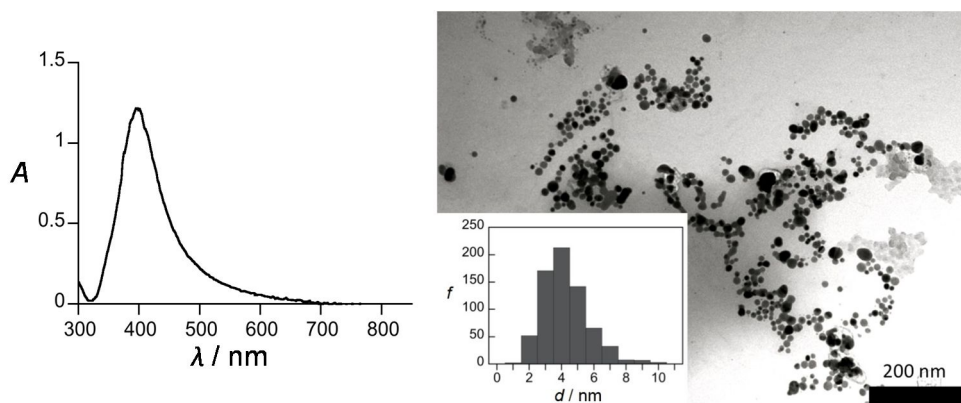


Figura 63. Síntesis TN4 preparada térmicamente por reducción con NaBH_4 (0.1%) en donde la mezcla de reacción se dejó bajo agitación durante una hora a 70°C. (izquierda) Espectro de absorción (dilución 2:12). (derecha) Imagen de TEM e histograma con la distribución de partículas.

Antes de estudiar las síntesis de AgNPs, se optimizará el método utilizando patrones de Ag^+ para obtener las condiciones experimentales adecuadas para conseguir la máxima respuesta.

6.4 Optimización y calibración del método desarrollado

Las experiencias se realizaron por duplicado. En primer lugar y teniendo en cuenta el perfil de los espectros (la oxTMB tiene su máximo de absorción a 656 nm), se decidió usar como señal analítica la diferencia de absorbancia (ΔA) de 543 a 656 nm (siendo 543 nm un mínimo de absorción) para compensar un incremento de línea base (en el caso de trabajar con NPs). Por su parte, un rango de trabajo entre 0-15 mg/L para los patrones de Ag^+ fue escogido. Estableciendo esto, se procedió a optimizar la concentración de TMB. Para ello, se analizó la respuesta de un patrón de 4 mg/L de Ag^+ aplicando el método colorimétrico (como se detalló en la sección 6.2) y variando la concentración de TMB entre 0-0.8 mM. La variación de la señal analítica se puede ver en la **Figura 64 a**. La máxima respuesta fue obtenida para una concentración de TMB de 0.66 mM. Por otro lado, para la selección del tiempo de reacción óptimo, se obtuvieron las rectas de calibrado en el rango de trabajo establecido para diferentes tiempos. A partir de 15 min, la pendiente (b) se mantenía en un valor relativamente constante. Por lo tanto, 15 min se fijó como tiempo de reacción para el resto de estudios.

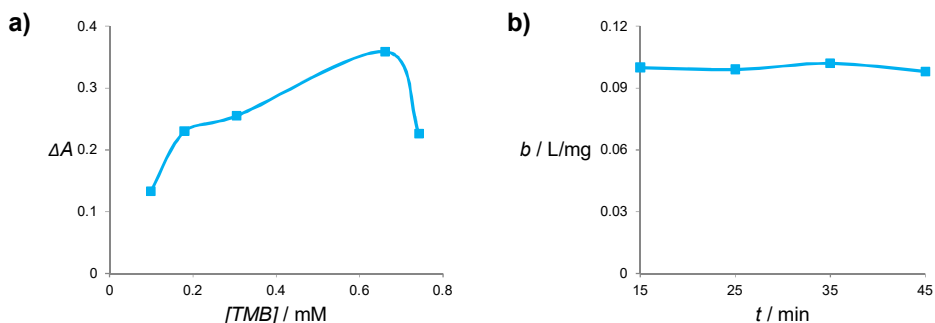


Figura 64. Optimización del método colorimétrico. a) Variación de la respuesta del método con la concentración de TMB (patrón de Ag^+ de 4 mg/L). b) Variación de la pendiente (b) de la curva de calibrado en función del tiempo de reacción.

La próxima etapa consistió en la obtención de los parámetros analíticos que se muestran en la **Tabla 38**. Se realizó una calibración externa en este caso; el LOD y el LOQ se

calcularon como las concentraciones de Ag^+ que proporcionaron una razón señal-ruido de 3 y 10 respectivamente, considerando la desviación estándar de 10 blancos; la precisión se evaluó intradía ($n=5$) como el RSD. El valor del LOD fue 0.6 mg/L (valor exacto de 0.58 mg/L equivalentes a 5.33 μM). Teniendo en cuenta que las concentraciones iniciales de Ag^+ en las síntesis son del orden de las decenas o centenas de mg/L, el valor del LOD es satisfactorio y se puede controlar la tasa de conversión (rendimiento) de dichas síntesis utilizando la presente metodología. En definitiva, se obtuvieron buenas figuras de mérito para el método colorimétrico propuesto.

Tabla 38. *Parámetros analíticos obtenidos para el método UV-Vis desarrollado.*

	Curva de calibrado	LOD	LOQ	RSD (%)	
	$b \pm s_b$ (L/mg)	R^2 (mg/L)	(mg/L)	Intradía ($n=5$)	
AgNPs	0.100 ± 0.004	0.993	0.6	1.9	3.1

6.5 Estudios preliminares en el análisis de AgNPs por el método propuesto

Las dispersiones de AgNPs poseen color debido a la SPRB. Por lo mismo, lo primero que hay que establecer es si la matriz en la cual las NPs fueron sintetizadas interfiere en el método UV-Vis en cuestión (i.e. si existe efecto matriz). Las pruebas se realizaron sobre un blanco de síntesis y la propia síntesis F1A en las condiciones optimizadas: 100 μL de TMB (concentración final de 0.66 mM) y 200 μL de tampón AcNa/AcH (1M, pH = 4) se añadieron a 1.2 mL del blanco o la muestra y se esperó 15 min, obteniéndose los espectros de absorción correspondientes.

Para el blanco de síntesis (que contenía la misma concentración de I-2959 y citrato trisódico que la síntesis F1A), una disolución incolora fue obtenida (ver el blanco (línea negra) de la **Figura 65 a**).

Para la muestra de NPs, se evidenció un cambio a amarillo azulado, indicativo de la oxidación de la TMB por la Ag^+ presente libre en la matriz y/o adsorbida en la superficie de las partículas (ver vial 2 en la **Figura 65 b**, representado antes en las **Figuras 60 b y c**). Dicho espectro de absorción puede ser considerado como el espectro suma (línea roja (2) de la **Figura 65 b**) del relativo a la oxTMB (con sus dos máximos) y la SPRB de NPs agregadas (una banda ensanchada y menos intensa [175-177]). De hecho, experimentos de

control mostraron que el tampón AcNa/AcH induce la formación de agregados (ver el espectro obtenido para AgNPs más tampón (línea roja) de la **Figura 65 a**).

De la misma forma, la adición de TMB/tampón a las AgNPs previamente fortificadas con 4 mg/L de Ag^+ dio lugar a absorción más intensa por parte de la oxTMB en un espectro resultante con la línea base más alta por la absorción de las NPs presentes (ver línea azul (3) de la **Figura 65 b**). Si se compara este perfil espectral con el obtenido para un patrón de Ag^+ de 4 mg/L procesado por el método (ver línea negra (1) de la **Figura 65 b**), se aprecia que son prácticamente idénticos con la salvedad del desplazamiento de la línea base (la similitud también en los viales 1 y 3 de la **Figura 65 b**).

De lo anteriormente obtenido, se puede afirmar que la Ag^+ residual de una dispersión de AgNPs puede ser determinada utilizando TMB, ya que ni la matriz de las NPs ni ellas mismas interfieren en el análisis.

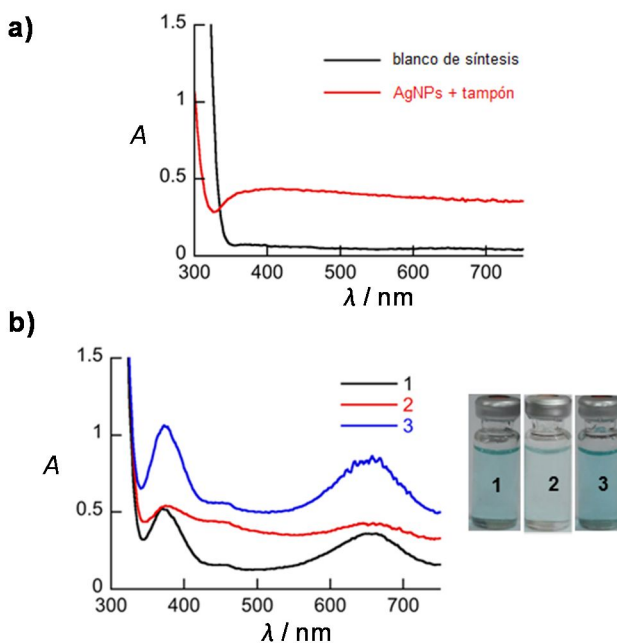


Figura 65. Estudios preliminares. a) Espectros de absorción obtenidos para un blanco de síntesis después de aplicar el método (línea negra) y para AgNPs en presencia de tampón AcNa/AcH (línea roja). b) Espectros de absorción de las muestras (1-3) después de aplicar el método y fotos de los viales respectivos. Muestra que corresponde a: (1) disolución resultante para un patrón de Ag^+ de 4 mg/L, (2) dispersión de AgNPs, (3) dispersión de AgNPs fortificadas con patrón de Ag^+ de 4 mg/L.

6.6 Calibración por el método de adición estándar

Para dar una prueba definitiva de que NPs y su matriz no interfieren, se realizó un calibrado por el método de adición estándar (SAM) sobre la síntesis F1A, el cual se comparó con el calibrado externo obtenido en la sección 6.4. En la **Figura 66** se representan tanto los espectros de absorción obtenidos para los diferentes niveles de concentración ensayados por el SAM y la comparación de la recta de este último con la conseguida por calibración externa. El valor de la pendiente fue de 0.105 ± 0.008 L/mg para el SAM, estadísticamente comparable con el obtenido por calibración externa (ver **Tabla 38**), lo que confirma que las AgNPs no interfieren en la metodología propuesta y por consiguiente, en la determinación de Ag^+ residual en el medio de las síntesis, además de no existir efecto matriz. Por lo mismo, se puede utilizar calibración externa en el análisis de las muestras.

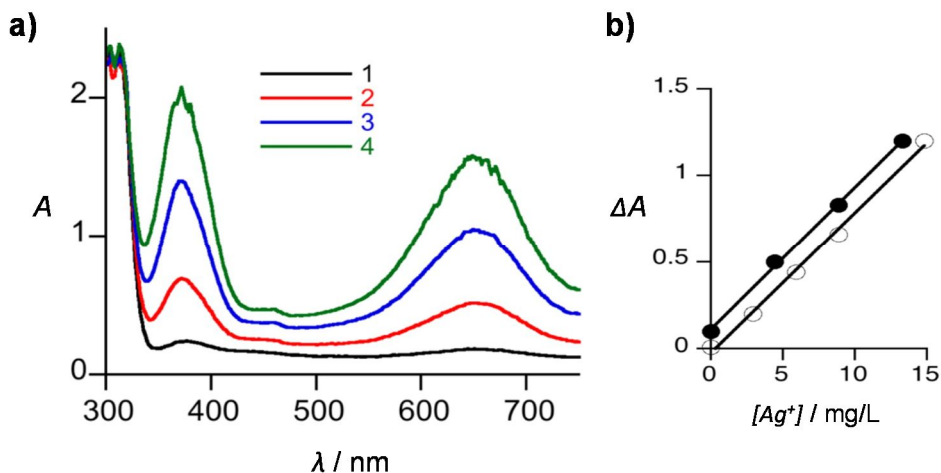


Figura 66. Calibración por el SAM y comparativa con la calibración externa. a) Espectros de absorción para las fortificaciones con patrón de Ag^+ en el rango 0-15 mg/L sobre la síntesis F1A procesadas por el método desarrollado. b) Comparación de las curvas obtenidas por el SAM (círculos negros) y calibración externa (círculos blancos).

6.7 Análisis de síntesis fotoquímicas

Se realizó el SAM en dos réplicas de la síntesis F1A (i.e. síntesis F1B y F1C) preparadas independientemente para evaluar la reproducibilidad síntesis a síntesis del método. Las curvas de calibrado obtenidas fueron prácticamente idénticas. Utilizando

calibración externa, se midieron las tres síntesis procesadas y a los 15 min de reacción. La concentración de Ag^+ residual estimada fue de 2.3, 3.0 y 1.1 mg/L (en promedio, 2.0 ± 0.9 mg/L) para las síntesis F1A, F1B y F1C respectivamente.

Para estimar el rendimiento de las síntesis, primero se determinó el contenido total de plata por GFAAS. Dichas síntesis (dilución 1:400 en agua) se midieron por esta técnica (rango de trabajo 0-100 ng/L) y el contenido de Ag se estimó en 20.4 ± 1.2 mg/L. Por lo tanto, la cantidad de Ag que forma parte de las AgNPs es 18.1, 17.5 y 19.3 mg/L para las síntesis F1A, F1B y F1C respectivamente (rendimiento total de 90%). Además, se midieron síntesis que se habían realizado variando el tiempo de irradiación: síntesis F2, F3 y F4 (ver **Tabla 37**) para las cuales la Ag^+ residual estimada fue de 1.3, 1.6 y 1.5 mg/L respectivamente (variación de rendimiento de sólo un 4%).

El hecho de determinar el porcentaje de rendimiento de una síntesis no es menor ya que para estimar la concentración de una síntesis de AgNPs, una de las estrategias se basa en calcularla a través de una fórmula matemática a partir del diámetro promedio de las partículas (que se obtiene por TEM [281-282]) con la suposición de que la conversión de la plata iónica en NPs es cuantitativa [283-284]. El método propuesto podría, por consiguiente, permitir una estimación más exacta de la concentración de las AgNPs.

Habiendo demostrado la utilidad del presente método, se diseñó un procedimiento para evaluar la naturaleza de la plata residual que se mide, i.e. si se trata de iones libres en el matriz de las síntesis o bien si de Ag^+ adsorbida en la superficie de las NPs.

6.8 Estudios sobre la naturaleza de la Ag^+ residual determinada

Para llevar a cabo este estudio, se estableció un procedimiento de purificación de las AgNPs que consistía en hacerlas pasar (1.2 mL) por un cartucho de intercambio catiónico (Strata SCX de partículas de SiO_2 unidas a grupos de tipo ácido bencensulfónico, 55 μm y capacidad para 3 mL), que se acondicionaron previamente con 1 mL de MeOH seguido de 1 mL de agua. El procedimiento de derivatización (método de la TMB) se realizó en las dispersiones eluidas.

Si se pasa la síntesis de AgNPs (en este caso, síntesis F1A) por un cartucho SCX la Ag^+ queda retenida dentro del mismo. El espectro de absorción para la dispersión eluida era idéntico al de las AgNPs sin eluir (misma SPBR). No obstante, dicha dispersión eluida seguía respondiendo en el método colorimétrico. Este resultado es interesante porque con la metodología propuesta se puede detectar la Ag^+ que está adsorbida en la superficie de las partículas. Esta hipótesis se verificó fortificando la síntesis F1A con un patrón de Ag^+ de 4 mg/L y la muestra fortificada resultante se hizo pasar por el cartucho SCX. Se observó una respuesta similar para las muestras fortificadas y sin fortificar. La **Figura 67** muestra los

espectros de absorción del experimento realizado. Esto confirma que el método de la TMB desarrollado no sólo detecta la plata iónica residual libre, sino también la que está adsorbida en la superficie de las partículas. Sin embargo, esta Ag^+ no se pudo cuantificar porque su concentración se encontraba por debajo del LOQ. Por lo tanto, el método colorimétrico cuantifica la plata iónica total de las dispersiones.

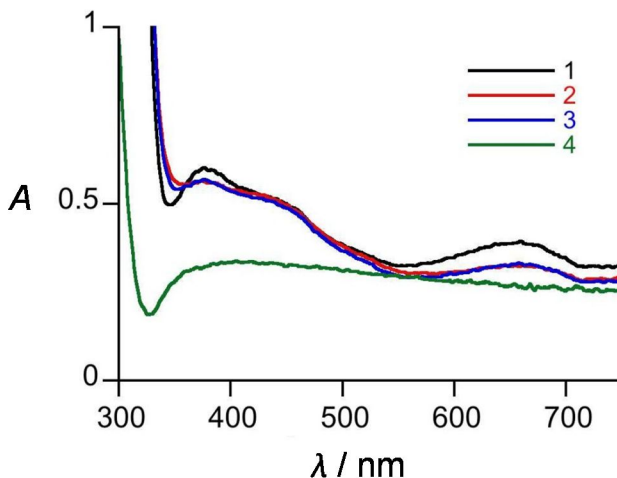


Figura 67. Espectros de absorción registrados después de adición de TMB/tampón a: (1) dispersión de AgNPs, (2) dispersión de AgNPs eluidas por cartucho SCX, (3) dispersión fortificada con 4 mg/L de Ag^+ pasada por cartucho SCX. El espectro obtenido para AgNPs mezcladas con tampón (4) fue añadido para la comparación.

6.9 Extensión del método: análisis de síntesis térmicas

Se probó la aplicabilidad del método propuesto para cuantificar el rendimiento de las síntesis midiendo la Ag^+ utilizando dos procedimientos térmicos bien conocidos cuya mayor diferencia es la naturaleza del agente reductor: citrato [248] o NaBH_4 [250]. Como calibración y para evaluar el efecto de una matriz diferente se utilizó SAM.

Para las síntesis obtenidas por el primer procedimiento (con citrato), se procesaron 2 réplicas preparadas independientemente (TCA y TCB, ver **Tabla 37**). Las ecuaciones del SAM obtenidas fueron $y = (0.09 \pm 0.01) \cdot x + (0.12 \pm 0.08)$ para TCA e $y = (0.09 \pm 0.01) \cdot x$ para TCB. Las concentraciones de plata iónica estuvieron por debajo del LOD. En cuanto a las síntesis obtenidas por el segundo procedimiento (con NaBH_4), se varió la cantidad de reductor (0.1% y 0.04% (w/v)), es decir, la razón de $\text{NaBH}_4\text{-Ag}^+$ era diferente en ellas. Para

0.1%, se cogieron 4 alícuotas (TN1, TN2, TN3 y TN4) que diferían en el tiempo al que se calienta la mezcla a 70°C (ver **Tabla 37**). Las pendientes de calibrado variaron desde 0.095 ± 0.004 L/mg (TN1, 5 min) a 0.090 ± 0.005 L/mg (TN4, 60 min), variando los rendimientos de síntesis de ~90% a 97% después de 1 h. Cuando se utilizó NaBH₄ al 0.04% (síntesis TN5), la concentración de Ag⁺ fue de 36 ± 6 mg/L después de calentar a 70°C por 1 h (nota: la cantidad de plata inicial en las síntesis que utilizaban NaBH₄ como reductor era de 107 mg/L).

Se debe destacar que, en todas las síntesis de AgNPs, se demostró que la matriz en la que las partículas se sintetizaron no interfería con el análisis. Un test t demostró que las pendientes para todas las curvas de calibrado realizadas eran estadísticamente comparables a un nivel de confianza del 95%. Por consiguiente, la metodología optimizada en esta Tesis puede ser extendida con éxito a AgNPs preparadas con otros métodos en lo que las partículas no sean tan grandes, ya que la dispersión comienza a ser un factor a considerar. En la **Tabla 39** se presentan los resultados en cuanto a Ag⁺ determinada para todas las síntesis ensayadas.

Tabla 39. Concentraciones de Ag⁺ total obtenida para todas las síntesis analizadas por el método colorimétrico de la TMB.

Síntesis	[Ag ⁺] (mg/L)
F1A/B/C	2.0 ± 0.9
F2	1.3
F3	1.6
F4	1.5
TN1	3.6
TN2	2.7
TN3	2.7
TN4	2.5
TN5	36.0
TCA/B	<LOD

6.10 Conclusiones

En resumen, se ha establecido una estrategia basada en un método colorimétrico con TMB que es general, simple, exacto, rápido y de bajo coste para cuantificar la conversión de Ag⁺ a AgNPs midiendo la plata catiónica directamente en el medio de reacción y por lo

mismo, evitando etapas adicionales de extracción o separación. Sumado a esto, se ha demostrado que parte de la plata iónica se queda adsorbida en la superficie de las partículas.

El método propuesto permite caracterizar las AgNPs diferenciando la naturaleza de la plata involucrada en las síntesis. Considerando que dichas partículas pertenecen al grupo de ECs y poseen efectos tóxicos que se relacionan a su capacidad de liberar Ag^+ , la metodología adquiere un interés mayor. Esta estrategia se puede utilizar tanto para la determinación “in situ” de rendimientos de AgNPs en un laboratorio, como también a un nivel técnico e industrial en el campo de la nanotecnología. Además, se pueden mejorar métodos existentes de caracterización de AgNPs (e.g. análisis por TEM para estimar concentraciones de partículas) al poder cuantificar las tasas de conversión de las NPs.

Capítulo 7.

AgNPs en matrices acuosas (Parte 2).

Otros ECs.

7.1 Análisis de AgNPs (Antecedentes)

Como se ha comentado en la sección 1.5.3.3 de la Introducción, se han desarrollado una gran variedad de métodos para caracterizar y determinar AgNPs para, por un lado, comprender de mejor manera el comportamiento de estas partículas en diferentes situaciones y por otro, para monitorizarlas en los diferentes compartimentos ambientales. El uso masivo de estos nanomateriales provoca que la exposición de la población tanto a las NPs como a las diferentes especies de plata (e.g. Ag^+) aumente [285], así como también su impacto ambiental en términos de toxicidad [286]. Su condición de ECs las convierte aún más en objeto de estudio de sumo interés para la comunidad científica.

De entre las metodologías empleadas para el estudio de NPs, la microscopía ha sido propuesta para estimar las concentraciones a partir del diámetro promedio de las partículas, es decir, del tamaño [189]. Pacioni y colaboradores propusieron un método basado en ecuaciones matemáticas para AuNPs que será discutido posteriormente. Uno de los supuestos en los que se fundamenta dicho análisis (discutido en el Capítulo 6) es que se asume que toda la plata catiónica se convierte en NPs. En el capítulo anterior, se probó que los rendimientos de las síntesis pueden no ser cuantitativos. Es por ello, que en este estudio particular de análisis por Cap-LC de AgNPs, todas las síntesis utilizadas fueron sometidas al método colorimétrico de la TMB anteriormente desarrollado y con ello se aseguró la ausencia de Ag^+ (especie que aumenta la dificultad de los análisis).

Por otro lado, la cuantificación de AgNPs en la mayoría de los casos se hace de manera indirecta a través de la determinación de Ag o Ag^+ después de etapas de reconversión de las partículas. En algunas ocasiones, se necesitan métodos de extracción (e.g. CPE) [193] y estrategias de funcionalización [202] que incrementan la manipulación y la complejidad de los estudios. Es más, al determinar otras especies de plata, no se mide una propiedad característica de las AgNPs y en el caso de que exista Ag^+ libre en la matriz de ellas o adsorbida en la superficie de las partículas, se cometería un error en la estimación (por exceso).

Por último, en este estudio se desarrollaron herramientas que se diferencian de los objetivos comunes de los métodos de la bibliografía. Estos últimos se han centrado en la especiación de las especies de plata y la separación de partículas por tamaño; en cambio y como se verá más adelante, las metodologías propuestas, además de responder a la concentración de las partículas (método de cuantificación), permiten estudiar propiedades relacionadas a la estabilidad, funcionalidad, polaridad y son aplicables a NPs no esféricas y de otra naturaleza (e.g. AuNPs, también del grupo de los ECs). Es más, pueden servir para detectar surfactantes (específicamente, catiónicos cuaternarios), ECs cuyos métodos de análisis escasean. Todo esto se realiza a través de medidas espectrofotométricas (relativas a la SPRB) en la detección del sistema cromatográfico.

Las metodologías empleadas (Cap-LC-DAD e IT-SPME-Cap-LC), están descritas en la sección 3.3.2.1 de la Metodología Experimental. Por su parte, los métodos de síntesis de AgNPs (básicamente método de Frank-Mirkin [239-240] y térmico [248]), así como las condiciones experimentales se pueden encontrar en las secciones 3.4.3 y 3.5 del mismo capítulo respectivamente. Por último, más información relativa a las muestras (AgNPs, AuNPs y surfactantes) está comentada en la sección 3.6 también de la Metodología Experimental. Para más información, consultar el Anexo 6.

7.2 Señal en el UV-Vis. Relación con el tamaño de las NPs.

Como se ha discutido, la mayoría de los métodos para analizar AgNPs determina a éstas en términos de la cantidad de plata a través de detección de MS [194,197-201]. En este estudio, se seleccionó a la SPRB como propiedad medible (siendo la SPRB característica particular para una clase de NPs metálicas [173]). Entonces, utilizando espectrofotometría UV-Vis, las AgNPs pueden ser identificadas por la banda de absorción centrada en 400 nm. En primer lugar, se debe estudiar si la señal en el UV-Vis responde a la concentración y/o al tamaño de partícula, también.

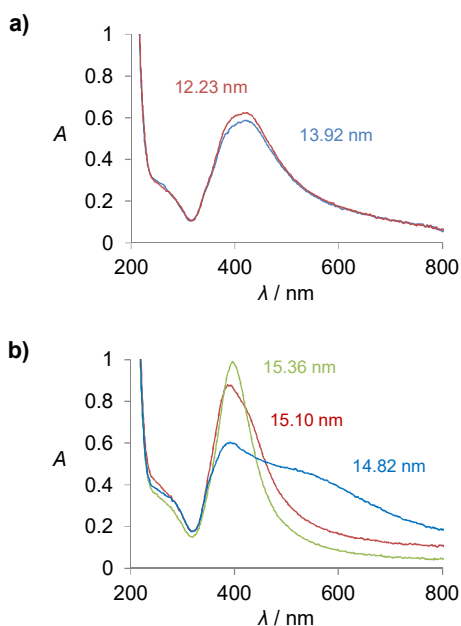


Figura 68. Comparativa UV-Vis/TEM. Espectro de absorción de las AgNPs con tamaños promedios de partícula calculados por análisis de TEM: a) diferentes y b) similares.

Se estudiaron dos situaciones: síntesis de AgNPs que poseían un espectro UV-Vis similar fueron medidas por TEM (como se explicó en la sección 3.2.2.2 de la Metodología Experimental) con el objetivo de determinar su tamaño y síntesis de tamaño similar (medidas también por TEM) se analizaron por espectrofotometría. En la **Figura 68** se representan los espectros obtenidos. No se obtuvo correlación entre la intensidad de la banda de absorción y el tamaño (que como se ha dicho se puede relacionar con la concentración [189]). Se puede concluir que la espectrofotometría UV-Vis no es la técnica adecuada para la cuantificación de AgNPs (i.e. la obtención de la concentración de las partículas), debido a que responde a numerosos factores (e.g. formas, estados de agregación [176,177]) y no directamente a la concentración. No obstante, esto no quiere decir que un sistema LC con detección UV-Vis no pueda ser utilizado para determinar AgNPs ya que, dependiendo de las condiciones cromatográficas específicas, la respuesta podría responder a la concentración.

7.3 Optimización de las condiciones cromatográficas en el sistema Cap-LC

Los primeros estudios se llevaron a cabo utilizando un método Cap-LC-DAD con válvula de inyección de volumen fijo (2 μ L). La etapa inicial consistió en optimizar dicho método con el objetivo de obtener la mayor respuesta del sistema (absorción a 400 nm). La señal analítica escogida corresponde al área de pico obtenida. La **Figuras 69** muestra los cromatogramas de los diversos experimentos realizados en consecuencia.

La composición de la fase móvil fue tomada de la literatura [197] y consistió en una disolución acuosa conteniendo SDS (10 mM), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 mM) y AcNH_4 (10 mM). Se optimizaron la naturaleza de la columna Cap-LC, la concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y el flujo del sistema cromatográfico. Una síntesis de tamaño 17.32 nm (medida por TEM) preparada por el método de Frank-Mirkin fue seleccionada para la optimización de parámetros.

Se ensayaron diversas columnas cromatográficas (de tamaño de partícula, poro, i.d. y largo): Zirchrom Sachtopore-RP (5 μ m, 100 Å, 0.3 mm, 10 cm), Zorbax SB-C18 (5 μ m, 80 Å, 0.5 mm, 3.5 cm), Zorbax SB-C18 (3.5 μ m, 80 Å, 0.5 mm, 3.5 cm) y Jupiter C18 (5 μ m, 300 Å, 0.5 mm, 5 cm). Para este estudio, el flujo se fijó a 10 μ L/min. El tamaño de partícula de la columna no afectó a la señal, mientras que al aumentar el tamaño de poro se incrementaron tanto el área de pico como el tiempo de retención. El mejor resultado (la señal analítica más intensa) se obtuvo con la columna Jupiter (ver **Figura 69 a**).

En cuanto al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, se probaron tres concentraciones: 0.5, 1.0 y 1.5 mM. El mejor perfil cromatográfico, en términos de altura y ancho de pico, se consiguió para 1.0 mM (ver **Figura 69 b**). Este reactivo se añade a la fase móvil para eluir por complejación especies de Ag^+ que pueden interactuar con la superficie de C_{18} modificada con SDS y así afectar las condiciones del sistema [197]. Aunque en el presente trabajo, la conversión de plata de las síntesis utilizadas fue cuantitativa (confirmada por el método colorimétrico de la TMB,

Capítulo 6) y la disolución oxidativa de las NPs a Ag^+ no es frecuente [173], este reactivo se conservó en la fase móvil por precaución.

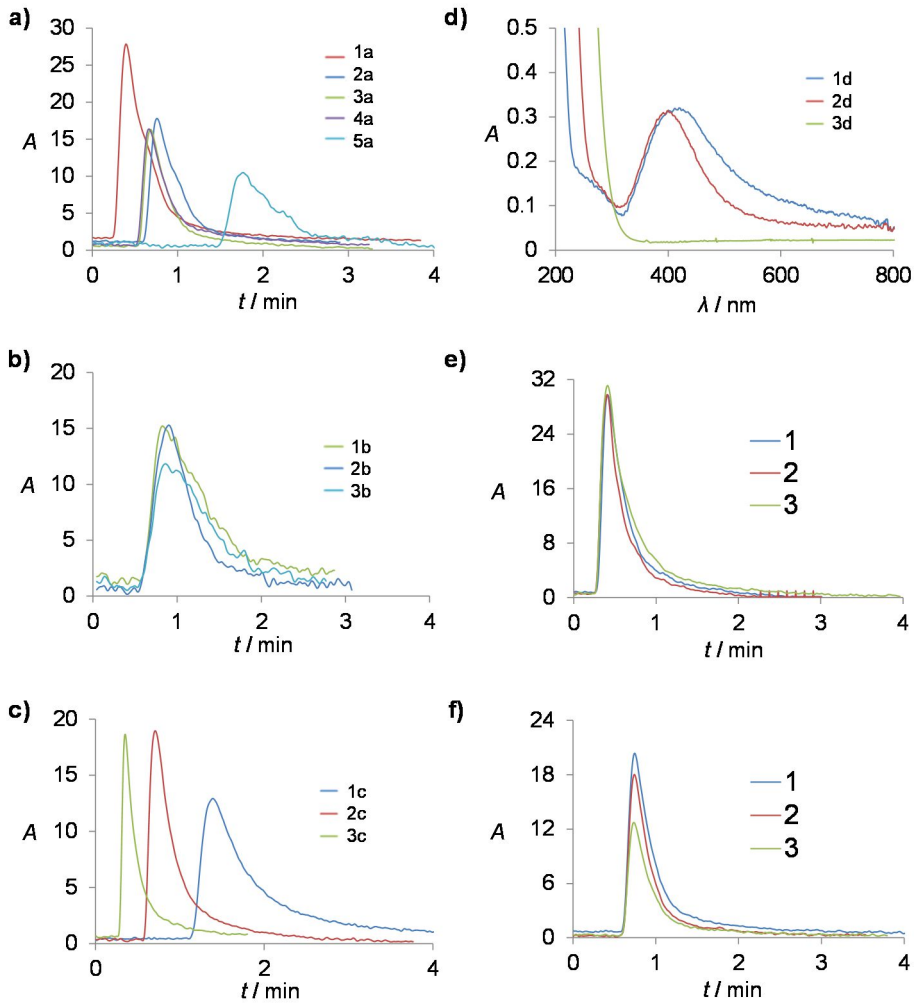


Figura 69. Optimización de las condiciones y relación señal analítica-tamaño de partícula en Cap-LC. a) Cromatogramas de AgNPs (1a) sin o con columna: (2a) Jupiter, (3a) Zorbax de tamaño de partícula 5 μm , (4a) Zorbax de tamaño de partícula 3.5 μm , (5a) Zirchrom. b) Cromatogramas de AgNPs con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: (1b) 0.5, (2b) 1.0 y (3b) 1.5 mM. c) Cromatogramas de AgNPs con diferentes flujos: (1c) 5, (2c) 10 y (3c) 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. d) Espectros de absorción UV-Vis de AgNPs (1:2) diluidas con (1d) agua y (2d) fase móvil, y (3d) el blanco de síntesis. Cromatogramas obtenidos (e) sin columna y (f) con columna Jupiter para AgNPs de: (1) 12.23, (2) 13.92 y (3) 16.19 nm en ambas situaciones.

El flujo también fue optimizado: medidas se realizaron a 5, 10 y 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ (este último corresponde al valor máximo permitido por el sistema). Los cromatogramas a diferentes flujos se aprecian en la **Figura 69 c**. Se eligió 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ porque el pico obtenido fue más alto y estrecho que el que se consigue trabajando a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, además de posibilitar un mayor contacto con la columna y una señal más alta que en el caso de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para todos los flujos, el espectro DAD registrado mostraba la SPRB con máximo a 400 nm.

Por otra parte, se preparó un blanco de síntesis siguiendo el método de Frank-Mirkin sin añadir AgNO_3 . El espectro UV-Vis se muestra en la **Figura 69 d** (3d). La absorción a 400 nm es prácticamente nula y no se obtuvieron picos cromatográficos en Cap-LC-DAD. A su vez, el efecto de la fase móvil en la agregación de la AgNPs se estudió por espectrofotometría UV-Vis (**Figura 69 d**). La fase móvil disminuyó la agregación (las bandas de absorción se estrecharon y el máximo se desplazó hacia longitudes de onda más cortas [178,203]), lo que la hace un transportador ideal para las partículas en el sistema. Por lo tanto, el factor dispersión es menor en Cap-LC comparado al análisis UV-Vis. Además, el SDS (CMC = 8.3 mM) tiene el efecto siguiente en el proceso: Zhou y colaboradores afirmaron que es el responsable de disminuir la adsorción irreversible de las NPs en los recubrimientos de las columnas de LC [201].

7.4 Relación entre la señal analítica en Cap-LC y el tamaño de las NPs

Cabe reiterar que todas las síntesis fueron producidas con rendimientos cuantitativos confirmados por el método de la TMB (con el que se asegura, por las cantidades implicadas, más de un 99% de conversión). En consecuencia, la ecuación que relaciona la concentración de AgNPs esféricas con el diámetro promedio de las partículas puede ser utilizada correctamente ya que la condición de conversión total se cumple. La fórmula (eq 1) puede ser simplificada y expresada como:

$$(1) d_{AgNPs} = \left(\frac{[Ag^+] \cdot d_{Ag}^3}{[AgNPs]} \right)^{1/3}$$

donde d_{AgNPs} , d_{Ag} , $[AgNPs]$ y $[Ag^+]$ corresponden al diámetro promedio de las partículas, diámetro atómico de la plata (0.289 nm), concentraciones de AgNPs y de plata inicial (como Ag^+ de AgNO_3) respectivamente. Como se puede ver ambos parámetros relativos a las AgNPs (d_{AgNPs} y $[AgNPs]$) varían inversamente (nota: al utilizar la eq 1 se deben tener en cuenta los factores de dilución que se realicen en las síntesis).

La eq 1 permite calcular d_{AgNPs} a partir de una $[AgNPs]$ medida (corregida por el factor de dilución y obtenida a partir de un área de pico interpolada en el correspondiente calibrado) por Cap-LC (i.e. análisis Cap-LC) o bien, de la medida de d_{AgNPs} (estimada por TEM, contando 500 partículas) obtener la $[AgNPs]$ equivalente (i.e. análisis por TEM).

La expresión anterior se obtuvo de la simplificación de dos ecuaciones (eq 2 y eq 3) que se adaptaron para el análisis de AgNPs (siendo empleadas originalmente para AuNPs [189]). En estas ecuaciones N representa la razón nanopartícula:átomo. Éstas se expresan como:

$$(2) N = \left(\frac{d_{AgNPs}}{d_{Ag}} \right)^3$$

$$(3) [AgNP] = \frac{[Ag^+]}{N}$$

Como se mencionó previamente, la señal en el UV-Vis está afectada por diferentes factores por lo que se podría esperar un comportamiento similar en el sistema Cap-LC-DAD debido a la naturaleza del detector. Entonces, se realizó un experimento que consistió en medir síntesis de diferentes tamaño (12.23, 13.92 y 16.19 nm) con y sin columna. Dichas síntesis fueron inyectadas individualmente sin columna y luego utilizando la columna Jupiter seleccionada (**Figuras 69 e y f** respectivamente). Cuando se empleó la columna, las señales cromatográficas decrecieron (absorbancia, medida como área de pico) en tanto que el tamaño de partícula aumentó (o la concentración calcula disminuyó). Por otra parte, los resultados obtenidos sin utilizar columna fueron comparables a los obtenidos por análisis UV-Vis. Por lo tanto, las señales en Cap-LC son proporcionales a la concentración. Esto se podría explicar porque en el sistema ocurre una interacción AgNPs-columna (la fase estacionaria C₁₈-SDS está cargada y existen especies iónicas en la fase móvil) en un proceso dinámico y se produce difusión de las partículas por los poros. Además se produce un mecanismo por exclusión de tamaños como en los estudios de Zhou y colaboradores [201].

7.5 Método Cap-LC-DAD

7.5.1 Calibración del método Cap-LC-DAD

Una síntesis de AgNPs (caracterizada por TEM) fue elegida como patrón. La caracterización completa de dicha síntesis (con d_{AgNPs} 17.32 nm) se muestra en la **Figura 70**. Se estimó su [AgNPs] a partir de d_{AgNPs} utilizando la eq 1. Luego, se realizó una calibración externa con el patrón y sus diluciones para obtener una curva de calibrado señal en Cap-LC (área de pico) vs [AgNPs].

Una dilución 1:8 de la muestra considerada como patrón (síntesis de 17.32 nm) resultó equivalente a una concentración de AgNPs de 0.431 nM. 5 diluciones de esta muestra y un blanco se inyectaron en el sistema Cap-LC-DAD para evaluar la linealidad. Se obtuvo una línea recta, lo que confirma que no se produjo modificación en el estado de agregación. La

curva de calibrado, así como los cromatogramas obtenidos para un patrón y un blanco se representan en la **Figura 71**.

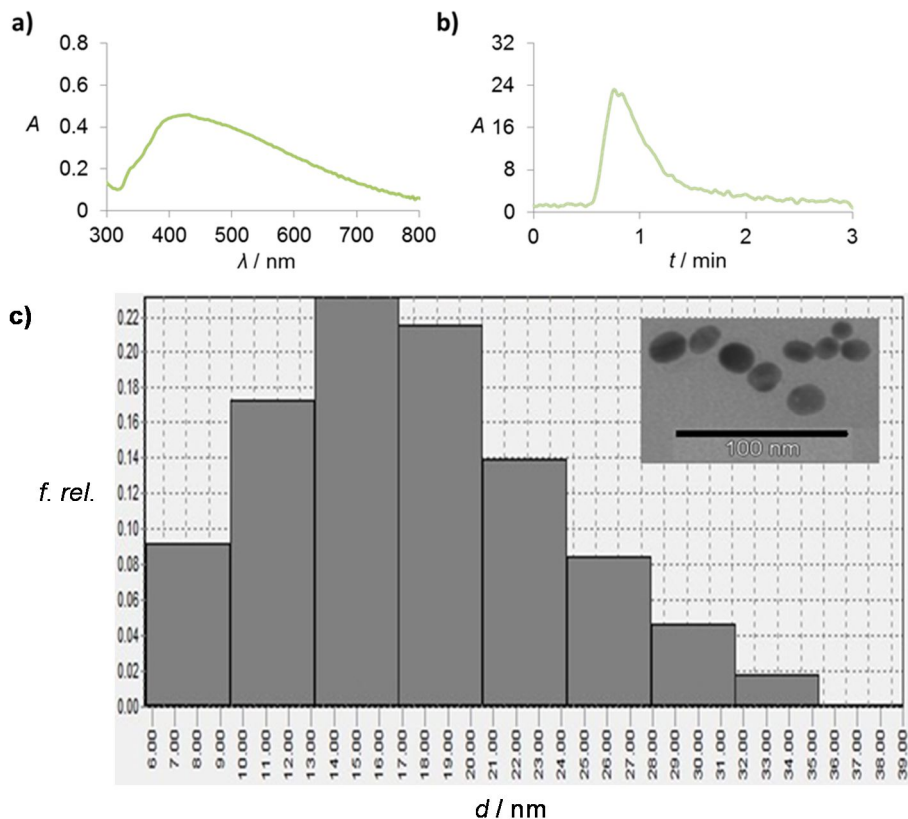


Figura 70. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 17.32 nm considerada como patrón. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:8). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Los parámetros analíticos se pueden ver en la **Tabla 40**. El LOD y el LOQ se calcularon como la concentración que proporcionó una razón señal-ruido de 3 y 10 respectivamente (criterios 3σ y 10σ). Una linealidad excelente ($R^2 = 0.9997$) y buena reproducibilidad (intradía, $RSD = 7.7\%$) fueron obtenidas.

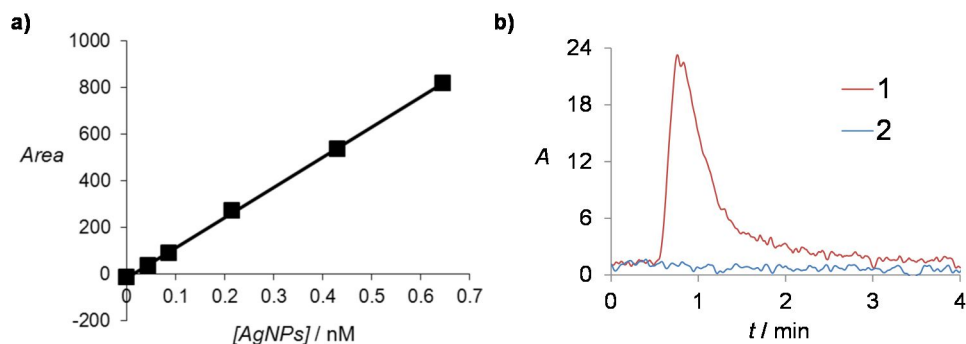


Figura 71. Resultados de la calibración en Cap-LC. a) curva de calibrado utilizando como patrones AgNPs de 17.32 nm y sus respectivas diluciones. b) Cromatogramas para: (1) AgNPs de 0.431 nM y (2) blanco.

Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de arrastre (“carryover”) para asegurar que las NPs no se quedaban dentro del sistema. Recuperaciones de más del 95% fueron obtenidas. Considerando que, por una parte, el porcentaje de partículas retenidas en el sistema [177] es bajo y constante y, por otra, el agua desorbe las NPs, este problema se mantuvo controlado. Para ello, se lavaba el sistema cambiando la fase móvil a 100% de agua entre las inyecciones. La columna duró más de 100 análisis sin pérdida significativa de señal.

Tabla 40. Parámetros analíticos obtenidos para el método de Cap-LC-DAD desarrollado.

R^2	Pendiente ^a [nM ⁻¹]	LOD ^b [nM]	LOQ ^c [nM]	$S_{Y/X}$ ^d	RSD ^e [%]	Rango de trabajo [nM]
0.9997	1289.7	0.015	0.051	6.35	7.7	0-0.65

^aSensibilidad, basada en la calibración utilizando área de pico, ^bcriterio 3σ , ^ccriterio 10σ , ^derror estándar de estimación, ^eintradía, $n=5$.

7.5.2 Caracterización de muestras de diferente tamaño y validación del método propuesto

Se prepararon 5 síntesis con diferentes tamaños utilizando el método de Frank-Mirkin (sección 3.4.3 de la Metodología Experimental) cuyos d_{AgNPs} fueron calculados por TEM. La

caracterización completa (TEM, UV-Vis y Cap-LC) para cada una se muestra en las Figuras 72, 73, 74, 75 y 76.

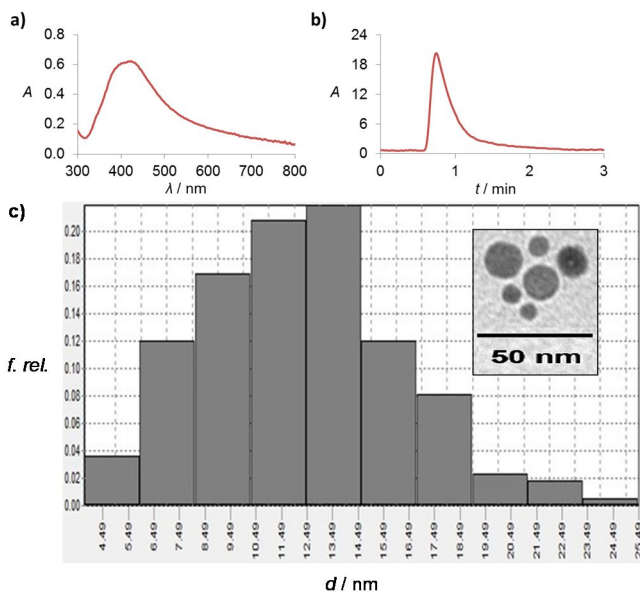


Figura 72. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 12.23 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:16). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Las muestras se diluyeron convenientemente para obtener señales dentro del rango de trabajo de 0-0.65 nM y poder medirlas por el método Cap-LC-DAD. Finalmente, usando la fórmula previamente discutida (eq 1), los d_{AgNPs} fueron estimados a partir de las concentraciones determinadas cromatográficamente (interpoladas en la curva de calibrado y corregidas por los factores de dilución).

A su vez, se calcularon los errores relativos utilizando los d_{AgNPs} estimados por TEM como valores verdaderos. Dichos errores estuvieron entre 1.64 y 4.45% (ver **Tabla 41**), por lo tanto el método desarrollado es exacto y tiene el potencial para ser utilizado como herramienta predictiva de tamaños de AgNPs. Un nuevo método Cap-LC ha sido establecido para predecir tamaños a partir de $[\text{AgNPs}]$ estimadas por cromatografía (operación inversa al análisis por TEM).

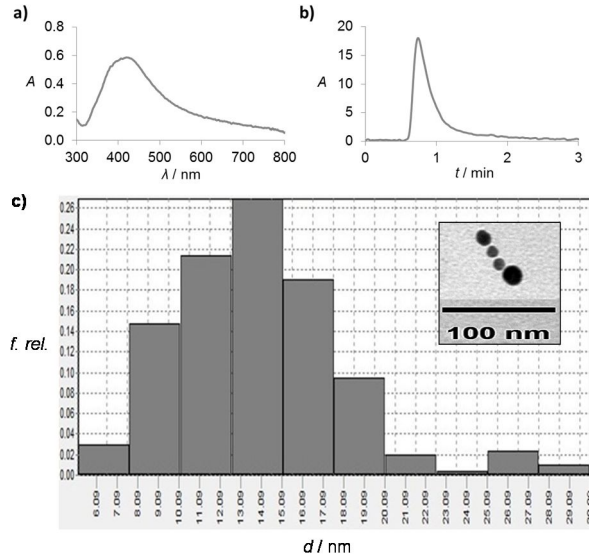


Figura 73. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 13.92 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:16). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

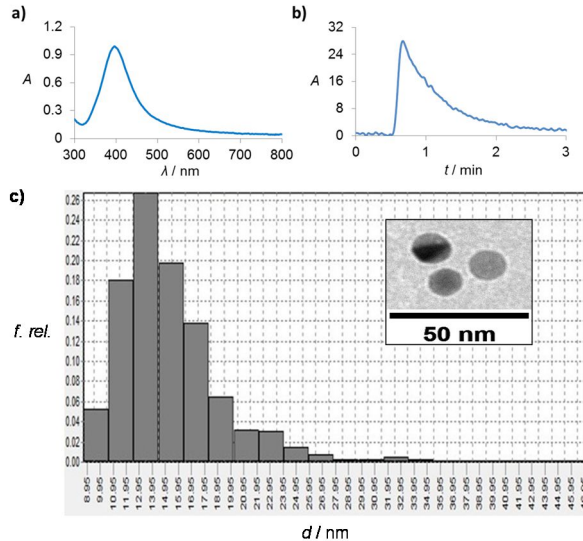


Figura 74. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 15.36 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:4). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:8). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

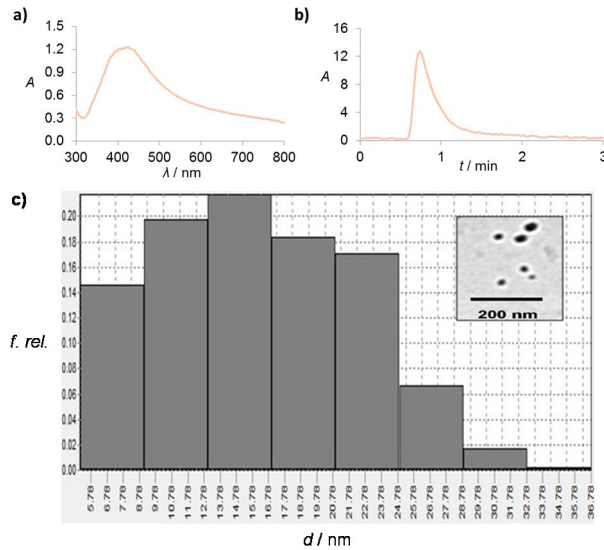


Figura 75. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 16.19 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:16). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

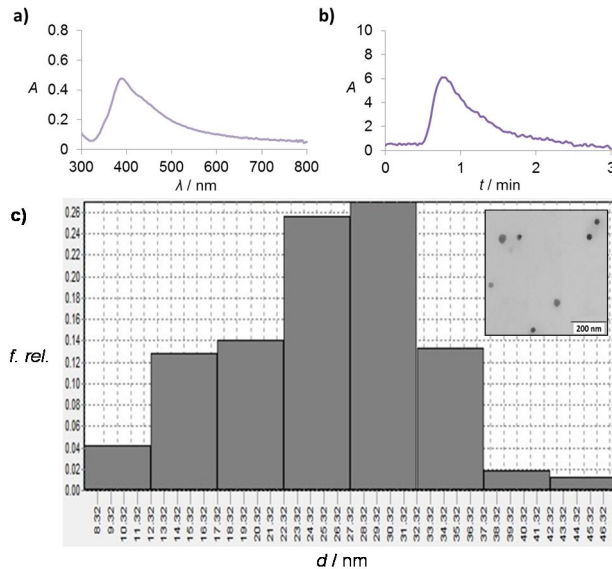


Figura 76. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 25.57 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:8). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Adicionalmente, se preparó una muestra empleando un método de síntesis térmico [248]. Con él, NPs de mayor tamaño (d_{AgNPs} de 38.15 nm) fueron obtenidas y cuya caracterización es presentada en la **Figura 77**. Esta muestra se diluyó a la mitad. En este caso, el error relativo calculado fue menor al 1%. La **Tabla 41** resume los resultados de la comparativa de los análisis de Cap-LC y TEM (que ha servido como validación de la metodología propuesta). En definitiva, ambos métodos proporcionan resultados comparables.

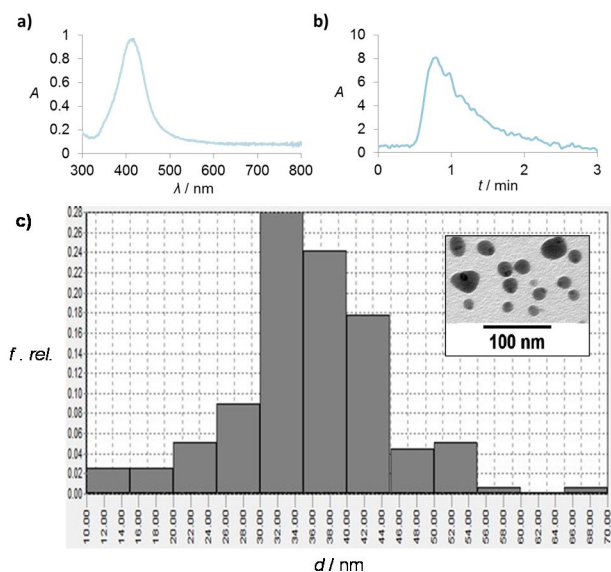


Figura 77. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 38.15 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:15). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:2). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Tabla 41. Estimación de tamaños de diferentes AgNPs por el método Cap-LC-DAD.

d_{AgNPs} (nm)		E. Rel. ^c	d_{AgNPs} (nm)		E. Rel. ^c
TEM ^a	Cap-LC ^b	(%)	TEM ^a	Cap-LC ^b	(%)
12.23	12.55	2.62	16.19	15.47	4.45
13.92	14.27	2.51	25.57	25.15	1.64
15.36	15.94	3.84	38.15	38.51	0.94

^amedida, ^bpredicha, ^cerror relativo; diámetro TEM considerado como valor verdadero.

Para completar este estudio, la **Tabla 42** muestra las concentraciones interpoladas de AgNPs calculadas a partir de los cromatogramas y las concentraciones corregidas (o finales) después de aplicar los factores de dilución. Aunque en esta tabla sólo se pueda ver una dilución por muestra, en la práctica otras diluciones fueron ensayadas y procesadas de la misma forma.

Tabla 42. Concentraciones y diluciones de las AgNPs procesadas por Cap-LC-DAD.

d_{AgNPs} (nm) medido por TEM	[AgNPs] (nM) interpolada en Cap-LC	Dilución muestra	[AgNPs] (nM) final en Cap-LC
12.23	0.57	1:16	9.12
13.92	0.39	1:16	6.24
15.36	0.56	1:8	4.48
16.19	0.30	1:16	4.80
17.32	0.43	1:8	3.45
25.57	0.14	1:8	1.14
38.15	0.22	1:2	0.44

7.5.3 Dependencia de la señal en Cap-LC con la concentración de AgNPs. Otros estudios.

Aunque los resultados conseguidos hasta el momento evidencian una dependencia entre la señal analítica en el método Cap-LC-DAD y la concentración de las partículas, otros estudios pueden llevarse a cabo para demostrar claramente que el sistema responde linealmente a la [AgNPs]. Se realizaron dos experimentos.

En el primero, se hizo una nueva calibración, pero esta vez utilizando como puntos del calibrado a las 7 síntesis de tamaños diferentes anteriormente ensayadas (incluyendo a las AgNPs de 17.32 nm consideradas como patrón). Esto significa que los puntos del calibrado son completamente independientes (y no una simple dilución de una muestra como en la sección 7.5.1). Del d_{AgNPs} calculado por TEM en cada caso, se puede calcular una [AgNPs] empleando la eq 1 y midiendo por Cap-LC-DAD se puede representar una nueva recta de calibrado (ver **Figura 78 a**). Se observó una respuesta lineal ($R^2 = 0.99$).

En el segundo experimento, una representación de Area vs [AgNPs] se llevó a cabo a 3 niveles de concentración diferentes (0.21, 0.42 y 0.63 nM), cada uno conteniendo 2 medidas

que provienen de muestras de AgNPs de diferente tamaño. El resultado se puede ver en la **Figura 78 b**. El ajuste obtenido fue lineal ($R^2 = 0.995$).

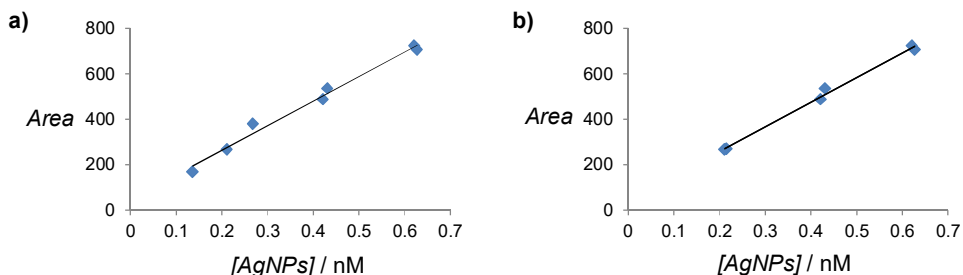


Figura 78. Relación de la señal de Cap-LC-DAD con [AgNPs]. a) Curva de calibrado obtenida utilizando como puntos 7 síntesis de NPs con diferentes tamaños. b) Representación Area vs [AgNPs] a 3 niveles de concentración diferentes (0.21, 0.42 y 0.63 nM) donde cada medida proviene de una muestra de tamaño distinto.

En resumen, el método desarrollado basado en la Cap-LC-DAD responde lineal y directamente a la concentración de AgNPs y por ello, indirectamente al tamaño de partículas, propiedad matemáticamente relacionada con la concentración (eq 1). Adicionalmente, es importante destacar que el tamaño de poro (del mismo orden de magnitud que los d_{AgNPs}) y la misma Cap-LC (donde las muestras no se diluyen tanto como en HPLC convencional) juegan un papel clave en el proceso, permitiendo que las partículas respondan de la manera antes señalada.

7.5.4 Otras aplicaciones y usos potenciales del método propuesto

Hasta este momento, sólo se han ensayado NPs esféricas en el método Cap-LC. Siguiendo el método de Frank-Mirkin y utilizando KBr en la síntesis, se obtuvieron nanoprismas (partículas con forma triangular). Estas dispersiones presentan una coloración azul. Se cambió la longitud de onda de detección de 400 a 600 nm (donde se encuentra el máximo de absorbancia para los nanoprismas). Se inyectaron diluciones de esta síntesis y los resultados se pueden observar en la **Figura 79** (i.e. cromatograma de Cap-LC, espectros UV-Vis y DAD, así como fotografías de las NPs). Con este experimento se demuestra que AgNPs no esféricas pueden ser analizadas. No se realizaron más experiencias al respecto, dejando un camino abierto en donde resultados prometedores pueden esperarse.

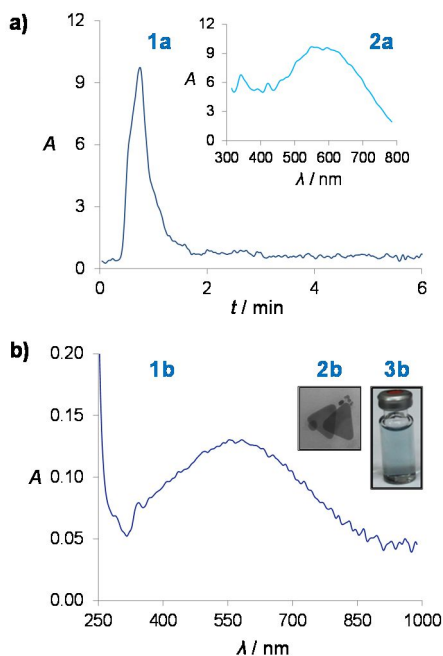


Figura 79. Estudios de AgNPs no esféricas. a) Resultados en Cap-LC: (1a) cromatograma a 600 nm para una dilución 1:8 de AgNPs y (2a) espectro DAD. b) Información adicional obtenida: (1b) espectro UV-Vis para una dilución 1:8 de AgNPs, (2b) imagen TEM y (2c) fotografía de un vial conteniendo nanoprismas.

También, el método permite el estudio de propiedades relacionadas con la estabilidad y la funcionalidad de las AgNPs evaluando la respuesta en Cap-LC. Teniendo en cuenta que las partículas son sometidas a estrés en el sistema cromatográfico, si síntesis degradadas o inestables responden o no en el método es un asunto que no ha sido discutido. Todas las síntesis ensayadas hasta ahora no se han deteriorado en el tiempo.

Bajo las mismas condiciones en las que se preparó la síntesis de 15.36 nm (denominada en este estudio como S1), nuevas NPs fueron preparadas, pero esta vez añadiendo 5 veces más de citrato trisódico (5% (w/v)). Este reactivo tiene un papel fundamental en el método de Frank-Mirkin: ser el capping (o estabilizante) y por otra parte, el agente reductor secundario [156]. Se puede esperar que las partículas generadas sean de mayor tamaño ya que más citrato puede estabilizar la nanoestructura. El análisis de TEM confirmó esta predicción: la nueva síntesis tuvo un d_{AgNPs} de 16.72 nm (denominada S2, ver **Figura 80 a**). Se inyectaron las dos muestras en el sistema Cap-LC. Los cromatogramas se pueden ver en la **Figura 80 b**. S2 no respondió correctamente en el método propuesto (el tamaño predicho

por Cap-LC fue mayor al calculado por TEM). Para establecer conclusiones preliminares sobre este hecho, ensayos adicionales se realizaron.

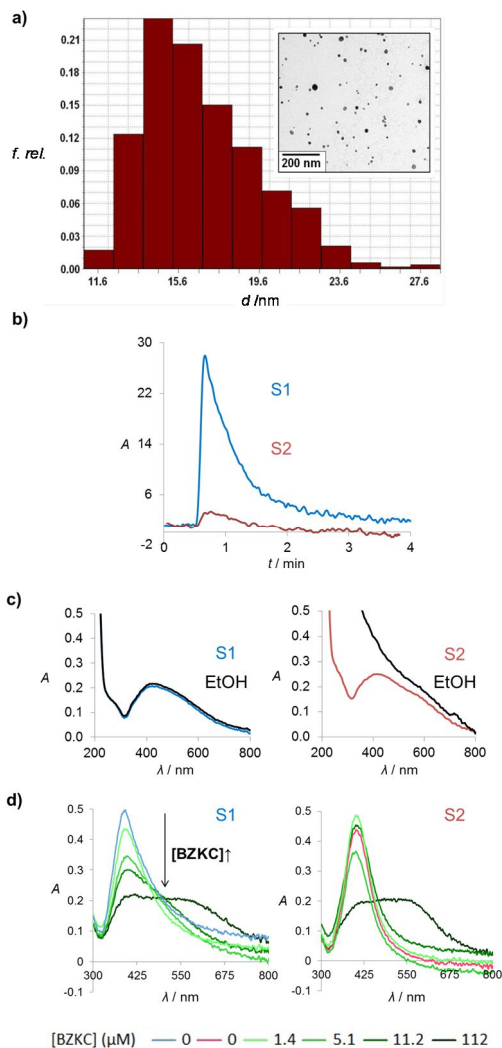


Figura 80. Estudios de estabilidad. a) Análisis por TEM: histograma de la distribución de partículas e imagen para la síntesis de 16.72 nm (S2). b) Resultados en Cap-LC para una dilución 1:8 de AgNPs de 15.36 nm (S1) y S2. c) Experimentos UV-Vis: espectros para S1 y S2 obtenidos para diluciones 1:16 en agua (línea azul o roja) y EtOH (línea negra). d) Espectros UV-Vis para S1 y S2 de series de muestras en las cuales se añadió BZKC de 0 (línea azul o roja) a 112 μM (series desde la línea verde más clara a la más oscura, concentraciones crecientes). Para S1, la tendencia de variación de señales fue confirmada, hecho no observado para S2.

Se ha afirmado en la bibliografía que las AgNPs son estables en EtOH [173]. Se utilizó este hecho para corroborar la estabilidad (en un disolvente orgánico específico) de ambas síntesis, que fueron diluidas (1:16) en agua (como blanco de la experiencia) y EtOH. Se registraron los espectros UV-Vis correspondientes. La SPRB para S2 fue completamente perturbada, mientras que para S1 permaneció inalterada en ambos disolventes. Los espectros se presentan en la **Figura 80 c**. Este hecho confirmó la inestabilidad de S2 y la respuesta anormal observada por Cap-LC-DAD.

También se evaluó una propiedad relacionada con la funcionalidad de las AgNPs utilizando una aplicación reciente de éstas: dichas partículas pueden ser empleadas para analizar surfactantes catiónicos cuaternarios (amónicos) en un método colorimétrico [203]. Este hecho es importante ya que estos surfactantes (como se comentó en la sección 1.5.4 de la Introducción) son considerados ECs. Ambas síntesis (S1 y S2) se utilizaron para detectar BZKC. Adiciones crecientes de BZKC (en este caso, en el rango de 0 a 112 μM) inducen la agregación de las AgNPs (cambio de color de amarillo-naranja a incoloro) a través del efecto hidrofóbico en medio ácido (se utilizó ácido diluido). Esta agregación es gradual: si la concentración de BZKC ([BZKC]) aumenta, también lo hacen el efecto hidrofóbico y la agregación de NPs. Para S1 se confirmó esta tendencia; en cambio, para S2, la agregación no fue gradual (aumentaba y disminuía de forma aleatoria). En otras palabras, una síntesis inestable en un disolvente orgánico y que no responde en el método Cap-LC-DAD, no puede detectar apropiadamente surfactantes catiónicos cuaternarios. Los resultados se muestran en la **Figura 80 d**. Para concluir este punto, se puede afirmar que el método propuesto puede proporcionar información relacionada a la estabilidad de las síntesis (e.g. estabilidad en disolventes y funcionalidad, ambas descritas en la literatura). Estos parámetros son difíciles de cuantificar por técnicas microscópicas. Es más, el método desarrollado permitiría mejorar una metodología descrita para analizar otros ECs, por medio de la selección de AgNPs estables y funcionales para dicho efecto.

7.6 IT-SPME: estudios preliminares y optimización

7.6.1 Interacción entre AgNPs y Capilares. Dependencia entre la señal obtenida y la [AgNPs].

El montaje de la IT-SPME-Cap-LC-DAD está descrito en la sección 3.3.2.1 de la Metodología Experimental (específicamente **Figura 34 b** y modo de inyección **Figura 33**).

La interacción entre AgNPs y diferentes matrices es objeto de estudio intenso en el presente. Cuando se las intenta inmovilizar en una determinada matriz, las partículas tienden a desprenderse de ella después de cierto tiempo [287,288]. Considerando esta información y la novedad de aplicar la técnica de IT-SPME en el estudio de NPs, se seleccionaron columnas capilares comerciales de PDMS (las más usadas en IT-SPME [79]).

Para evaluar la interacción entre AgNPs y el capilar de PDMS, existe una variable que debe ser controlada: el disolvente utilizado como dispersante de las NPs, en este caso el agua. El efecto del agua sobre las AgNPs ha sido discutido en la literatura sugiriendo que las partículas pueden potencialmente cambiar en este medio [173,177]. En los estudios realizados con el método Cap-LC, teniendo en cuenta que, por una parte, no ocurrió separación (i.e. sólo un pico cromatográfico fue obtenido para cada una de las muestras inyectadas, que eran a su vez diluciones acuosas) y que, por otro, cuando se realizó la calibración, curvas lineales se consiguieron (las partículas no cambiaron su estado de dispersión, ver **Figuras 71 y 78**) con resultados reproducibles, se puede afirmar que el efecto del agua estaba bajo control (además, el volumen de inyección fue siempre el mismo).

El empleo de la IT-SPME no sólo incrementa el largo del sistema, sino también provee una fase adsorbente proclive a interactuar con las AgNPs. Por lo mismo, estudios preliminares deben realizarse utilizando síntesis de NPs sin diluir (sin realizar el último paso de dilución del método de Frank-Mirkin, sección 3.4.3 de la Metodología Experimental).

Para estas experiencias, se empleó un capilar de PDMS TRB-35 de 70 cm de largo (volumen interno de 56 μL). Como patrón, se escogió la síntesis de AgNPs de 17.32 nm (utilizada antes con el mismo fin en el método Cap-LC). El flujo del sistema se fijó en 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

El primer experimento consistió en inyectar volúmenes crecientes del patrón sin diluir (8, 16 y 32 μL). Los cromatogramas para cada volumen de inyección se pueden observar en la **Figura 81 a**. Para 8 y 16 μL , sólo se obtuvo un pico cromatográfico. Cuando el volumen se aumentó a 32 μL , la señal se desdobló manteniendo el pico obtenido para menores volúmenes de inyección y añadiendo otro probablemente debido a la saturación de partículas en el sistema (absorbancia cerca de 1200 mA). Los espectros DAD medidos (esquina superior derecha de la **Figura 81 a**) para ambos picos corresponden a las mismas NPs (idéntica SPRB).

Un segundo estudio se llevó a cabo para demostrar que la IT-SPME-Cap-LC-DAD responde a la concentración de AgNPs así como lo hizo la Cap-LC-DAD. Volúmenes iguales (8 μL) de 2 síntesis de diferente tamaño (12.23 y 38.15 nm) fueron inyectados. Los cromatogramas para ambas muestras se presentan en la **Figura 81 b**, así como los espectros DAD respectivos. La IT-SPME-Cap-LC responde a la concentración (más información sobre este hecho será discutida más adelante). Por otra parte, los tiempos de retención se comportaron como en los estudios realizados por Zhou y colaboradores [201], hecho que sugiere que el mecanismo de exclusión por tamaños juega un papel importante en el método en cuestión.

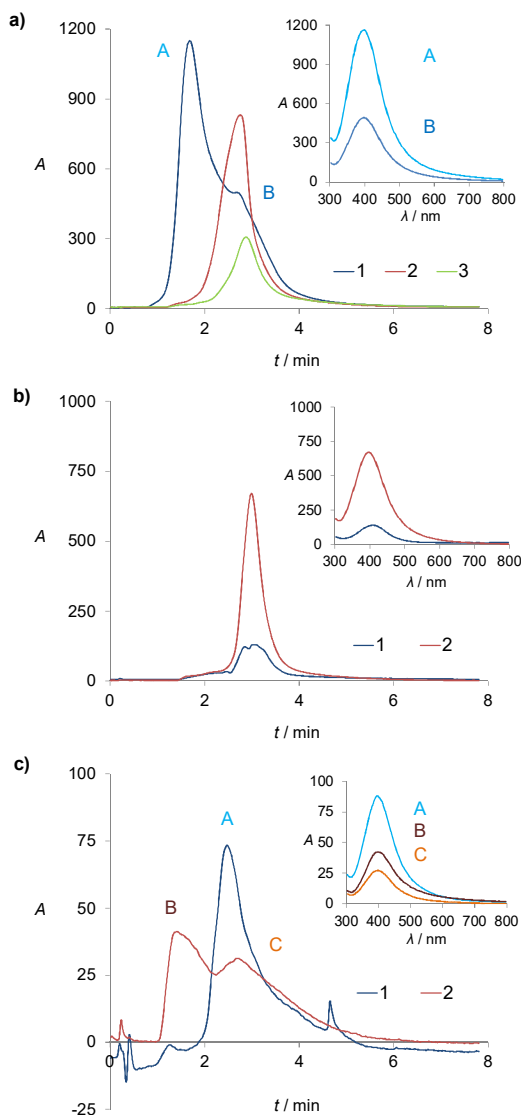


Figura 81. Estudios preliminares en la metodología IT-SPME-Cap-LC-DAD. Cromatogramas y espectros DAD (esquina superior derecha de las figuras) para: a) AgNPs de 17.32 nm con volúmenes de inyección de (1) 32, (2), 16 y (3) 8 μL ; A y B representan el máximo de la señal (1) en donde los espectros DAD fueron medidos. b) 8 μL de muestras de (1) 38.15 y (2) 12.23 nm; los espectros DAD fueron medidos en el máximo de señal de cada una de ellas. c) Muestra de 17.32 nm (1) directamente inyectada en el loop lleno de agua y (2) inyectada después de ser diluida con agua fuera del sistema; A, B y C representan los máximos de señal en donde los espectros DAD fueron medidos.

7.6.2 Efecto del agua y mecanismo de separación en IT-SPME-Cap-LC

Como el dispersante utilizado es agua y la IT-SPME provee un medio orgánico (la fase adsorbente), pueden ocurrir numerosos procesos [177,188]. Primero, el patrón (17.32 nm) fue diluido en proporción 1:6 con agua y 30 μL de esta dispersión fueron inyectados en el sistema. Por otra parte, se realizó otra prueba: el capilar se llenó con agua y 5 μL del patrón sin diluir se inyectaron (en ambos casos, la cantidad de AgNPs es la misma). Los dos cromatogramas pueden verse en la **Figura 81 c**. Para el segundo caso, sólo se obtuvo un pico. Sin embargo, cuando la síntesis se diluyó fuera del sistema (o fuera de línea) para luego ser procesada (factores como el tiempo, luz, cantidad de agua, agitación difieren a los de una dilución en línea), el cromatograma presentó dos picos y los espectros DAD de éstos no coincidieron en términos de perfil (espectros B y C en la esquina superior derecha de la **Figura 81 c**). El agua pudo cambiar superficialmente el capping de diferentes maneras [177,289] en la dilución fuera de línea. En este caso un grupo de NPs se hizo más polar (no hubo una saturación de partículas en el sistema como en la sección anterior). Adicionalmente, se realizó una inyección llenando el capilar de 70 cm con 60 μL de agua, obteniéndose un pico tardío que correspondía a una interferencia (cromatograma y espectro DAD se muestran en la **Figura 82 a**) que también aparece en el cromatograma 1 de la **Figura 81 c**.

Los principios que explican la retención de partículas y el mecanismo de separación podrían ser el efecto hidrofóbico y la exclusión por tamaños. El efecto hidrofóbico [203] puede ser la fuerza motora del sistema: las AgNPs se rodean por los grupos orgánicos de la fase PDMS TRB-35 y se mantienen adsorbidos hasta que la fase móvil pueda romper esta interacción. Cuando las NPs son diluidas con agua fuera del sistema, algunas partículas se vuelven más polares. En posteriores secciones concernientes a las AuNPs, esta observación será tratada nuevamente.

7.6.3 Optimización de la columna capilar en el estudio de dispersiones acuosas de AgNPs

Como trabajar con muestras sin diluir daría una información similar a la del método Cap-LC-DAD previamente desarrollado (a excepción de que acoplado la IT-SPME, la retención de las NPs aumenta y el sistema permite procesar mayores volúmenes de muestra), se debe optimizar el sistema para estudiar dispersiones acuosas de AgNPs. Por una parte, se optimizó la naturaleza del capilar en cuanto a porcentaje de grupos difenilo, ensayando capilares de PDMS TRB-5 y TRB-35 (los cromatogramas se muestran en la **Figura 82 b**). Por otra parte, se probaron diferentes longitudes de columna: 20, 35 y 70 cm correspondientes a volúmenes internos de 16, 28 y 56 μL respectivamente. En términos de separación de pico, el capilar de PDMS TRB-35 de 35 cm de largo proporcionó los mejores resultados.

No sólo capilares de PDMS TRB fueron ensayados. Capilares funcionalizados con c-SWCNTs preparados con el método de síntesis de Slentz [245] fueron también utilizados. No obstante, los resultados no fueron tan buenos como los obtenidos para los capilares de PDMS en cuanto a la intensidad de la señal de las AgNPs en el sistema.

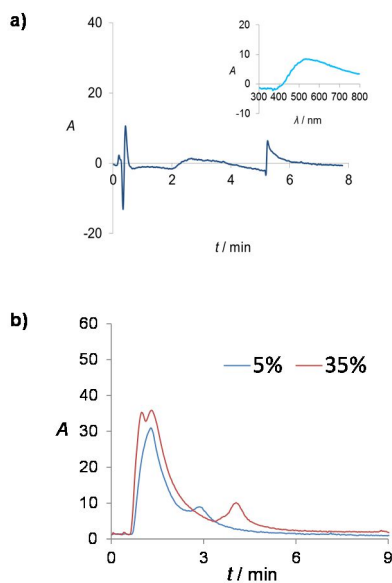


Figura 82. a) Cromatograma de un blanco (loop lleno con agua) y espectro DAD del último pico (arriba a la derecha) utilizando un capilar de PDMS TRB-35 de 70 cm de largo. b) Cromatogramas obtenidos utilizando diferentes adsorbentes (variando en su porcentaje de difenilo) para un capilar de PDMS de 35 cm.

7.6.4 Separación por tamaños y distribución de las señales

Habiendo realizado la optimización para la IT-SPME, el paso siguiente consistió en ensayar síntesis de AgNPs de tamaños diferentes para comprender como las partículas se distribuyen a través del sistema cuando dispersiones acuosas están involucradas: NPs de 12.23, 13.92, 16.19, 25.57 y 38.15 nm fueron inyectadas (dilución 1:32 y volumen de inyección 10 μ L). Los resultados se muestran en las **Figuras 83 a y b**. Para muestras de partículas pequeñas, se consiguieron 2 picos y para la síntesis que contenía las NPs más grandes (38.15 nm), un 3^{er} pico se distinguió claramente. En esta síntesis en particular (térmica), un grupo de partículas tuvo una interacción más fuerte con la fase PDMS, dando lugar a este pico tardío.

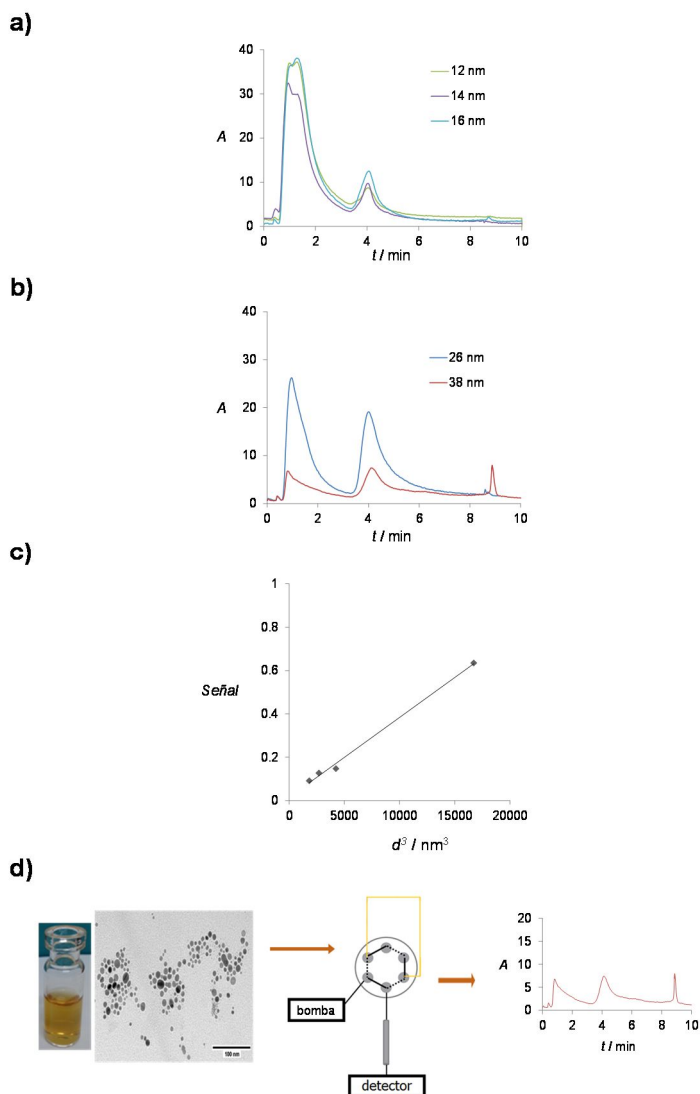


Figura 83. Metodología IT-SPME-Cap-LC-DAD. Cromatogramas obtenidos para síntesis de AgNPs de diámetro: a) 12.23, 13.92 y 16.19 nm. b) 25.57 y 38.15 nm. c) Representación de Señal (razón de áreas 2^{do} pico:1^{er} pico) vs d^3 para las diferentes AgNPs. d) Esquema del procedimiento de IT-SPME-Cap-LC: las partículas de una determinada síntesis se distribuyen y separan en grupos cuando atraviesan el sistema cromatográfico.

Para estudiar la distribución de señales, las síntesis de AgNPs que proporcionaron 2 picos cromatográficos se utilizaron para comprender la relación entre las señales de estos

picos (razón área de 2^{do} pico:área de 1^{er} pico, “Señal”). Como se puede ver en las **Figuras 83 a y b**, el primer pico (correspondiente a las NPs que no interactúan con la fase adsorbente) es mayor comparado al segundo pico (NPs adsorbidas en la fase PDMS) cuando el tamaño (relacionado a d_{AgNPs}) es menor.

Se encontró que la razón de áreas calculada (i.e. “Señal”) fue proporcional al volumen de las partículas (en otras palabras, al cubo del diámetro de las NPs, d^3). El motivo de considerar el volumen de las partículas viene del hecho que la fórmula que relaciona concentración y diámetro de partículas (eq 1, 2 y 3 de la sección 7.4) se basa en la premisa que el volumen de una partícula es igual a N veces el volumen de átomos (en este caso, de plata) individuales (N es proporcional al volumen de partícula y por ende, a d^3). Por lo tanto, si la señal analítica (área o razón de áreas) responde linealmente a la concentración, que es a su vez una función de N (ver eq 3 en sección 7.4), la razón (que puede ser considerada un área normalizada) se espera que dependa linealmente con d^3 . La **Figura 83 c** presenta los resultados de esta experiencia. Una relación lineal ($R^2 = 0.996$) fue observada. El perfil de un cromatograma es, por consiguiente, característico del tamaño de una síntesis.

Para dispersiones acuosas de AgNPs, la razón considerada de señales aumentó así como el d_{AgNPs} lo hizo y hubo una relación lineal entre esta razón y d^3 (y entonces, el volumen de las partículas). Como se dijo previamente, el capping de las NPs (capa superficial que implica un volumen) puede potencialmente cambiar [289] y es razonable pensar que el agua polarice más fácilmente las partículas más pequeñas que las grandes y por lo tanto, el primer pico sea mayor que el segundo. Resumiendo, la distribución de señales en la IT-SPME-Cap-LC-DAD para dispersiones acuosas responde al tamaño de AgNPs. Además de proveer mayor sensibilidad (el volumen de inyección del sistema aumenta de 2 a 28 μL para un capilar de 35 cm de largo) comparado al método Cap-LC, la IT-SPME-Cap-LC permite también estudiar el efecto del dispersante de las síntesis de AgNPs. Un esquema del procedimiento se muestra en la **Figura 83 d**.

7.7 Método IT-SPME-Cap-LC-DAD. Estudio de otros ECs.

7.7.1 Calibración del método propuesto

Utilizando la síntesis patrón (AgNPs de 17.32 nm), se llevó a cabo la calibración. Para esta muestra, se obtuvieron 2 picos como se podía esperar. La razón de los picos calculada para cada dilución del patrón permaneció prácticamente inalterada y fue de 0.22 ± 0.02 . Si se interpola esta razón en la curva previamente obtenida (Señal vs d^3 , **Figura 83 c**), se obtiene un d_{AgNPs} de 17.7 nm (error relativo de 2.19%). Este resultado es importante debido a que la razón entre 2 picos (“Señal”) puede ser considerada un parámetro para cada síntesis que es independiente de la dilución de la muestra para un volumen fijo de inyección (en este caso, 10 μL). Esta característica hace que el método IT-SPME-Cap-LC sea ideal para

análisis cualitativos rápidos (e.g. screening): comparar tamaños en síntesis diferentes o en una misma síntesis.

Los cromatogramas para los distintos niveles de concentración, así como la curva de calibrado están representados en la **Figuras 84 a y b** respectivamente.

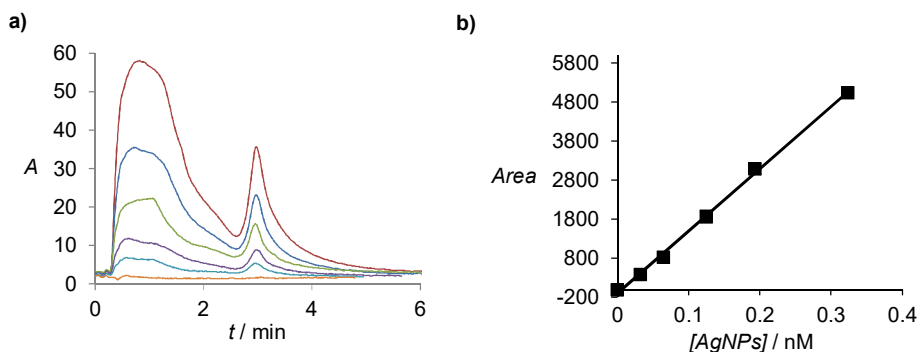


Figura 84. Calibración del método IT-SPME-Cap-LC-DAD. a) Cromatogramas obtenidos para un blanco y 5 niveles de concentración empleando como patrón la síntesis de AgNPs de 17.32 nm en un rango de 0-0.33 nM. b) Curva de calibrado utilizando como patrón la síntesis de AgNPs de 17.32 nm.

Tabla 43. Parámetros analíticos para el método IT-SPME-Cap-LC-DAD desarrollado.

Señal Analítica ^a	R ²	Pendiente ^b [nM ⁻¹]	LOD ^c [nM]	LOQ ^d [nM]	S _{Y/X} ^e	RSD ^f [%]
área total	0.998	15980	0.00171	0.00571	91.2	6.55
área del 1 ^{er} pico	0.998	13207	0.00207	0.00691	76.4	6.04
área del 2 ^{do} pico	0.998	2807	0.00975	0.03249	17.1	10.57

^aRango de trabajo de 0 a 0.33 nM, ^bsensibilidad, basada en la calibración utilizando el área de pico, ^ccriterio 3σ, ^dcriterio 10σ, ^eerror estándar de estimación, ^fN=5, intradía.

Los parámetros analíticos obtenidos se presentan en la **Tabla 43**. Como señal analítica se utilizó la suma de las áreas de los dos picos, aunque la calibración se podría hacer seleccionando cualquiera de las dos áreas ya que la linealidad es adecuada en todos los

casos. Comparando con los resultados obtenidos para el método Cap-LC-DAD (ver **Tabla 40**), en la calibración de la IT-SPME-Cap-LC-DAD se consiguieron una mayor sensibilidad (valores más altos de las pendientes de calibrado), mejores LODs y LOQs y tanto la linealidad (R^2) como la precisión fueron comparables. Globalmente, procesar mayores volúmenes de muestra acoplado la IT-SPME al sistema cromatográfico no sólo significó lograr una distribución de las partículas en dispersiones acuosas (lo que ya es una información valiosa), sino también mejorar los parámetros analíticos notablemente en cuanto a sensibilidad.

7.7.2 Extensión del método a otras NPs esféricas: las AuNPs

Dispersiones comerciales de AuNPs de tamaños conocidos (5, 20 y 40 nm) fueron ensayadas como patrones de referencia en el método desarrollado para confirmar la hipótesis de la separación que ocurre cuando las partículas se dispersan en agua.

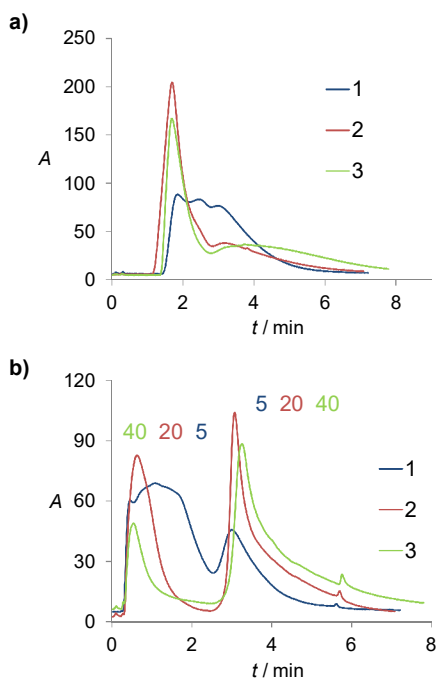


Figura 85. Cromatogramas obtenidos a 530 nm para síntesis de AuNPs comerciales: a) sin diluir y b) diluidas con agua de (1) 5, (2) 20 y (3) 40 nm.

La detección del sistema (DAD) permite monitorizar la señal a 530 nm que corresponde a la longitud de onda del máximo de absorción para las AuNPs. Los tres patrones (5, 20 y 40 nm) fueron inyectados sin previa dilución (volúmenes de inyección de 5, 12 y 16 μL respectivamente). Los cromatogramas se pueden ver en la **Figura 85 a**. En el estudio de AgNPs, el mecanismo más importante fue la exclusión por tamaños y el orden de elución fue similar al reportado por Zhou y colaboradores [201]. Cuando las AuNPs se diluyeron con agua, el mismo comportamiento que el exhibido por las AgNPs fue observado (ver **Figura 85 b**): las partículas se separan en 2 grupos (uno más polar y el otro más hidrofóbico). La razón calculada para las señales (área del 2^{do} pico:área del 1^{er} pico) aumentó así como lo hizo el d_{AuNPs} (valores de 0.4, 1.4 y 3.4 respectivamente). Por lo tanto, con este resultado, el método propuesto puede extenderse al análisis de otras NPs esféricas.

Como muestra la **Figura 85 b** para las AuNPs, los tiempos de retención variaron levemente para los diferentes tamaños. Para el primer pico, el tiempo de retención va de mayor a menor tamaño de partícula y para el segundo (probablemente por el efecto hidrofóbico) el mecanismo es el opuesto. Cabe recalcar que el fenómeno que responde al tamaño de NP es la redistribución causada por el dispersante fuera del sistema.

Adicionalmente, se analizó una mezcla de AuNPs. Las partículas de ésta se redistribuyeron, obteniéndose una razón de áreas intermedia. Esto sugiere que las NPs interactúan entre ellas. La **Figura 86** evidencia que ocurren tanto la polarización como la redistribución de partículas causadas por el dispersante (i.e. el agua).

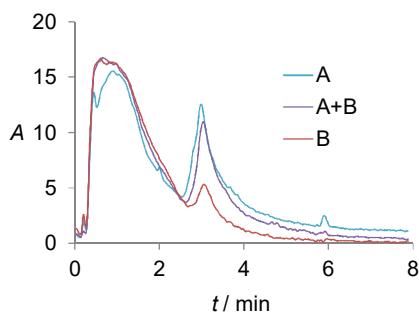


Figura 86. Cromatogramas obtenidos a 530 nm para un patrón A (AuNPs de 20 nm, dilución 1:8), un patrón B (AuNPs de 5 nm, dilución 1:16) y una mezcla A+B (AuNPs de 20 nm, dilución 1:8, más AuNPs de 5 nm, dilución 1:16).

7.7.3 Comparación con otras técnicas

La técnica DLS (comentada en la sección 3.2.1.3 de la Metodología Experimental) proporciona información sobre la distribución, la polidispersidad y los tamaños promedios de las NPs dentro de un líquido [290]. En ella, el tamaño de una partícula (i.e. el diámetro hidrodinámico de la partícula) se estima a partir de su difusión translacional (D) en un fluido. Ambos parámetros se relacionan a través de la ecuación de Stokes-Einstein. Experimentalmente, las muestras se exponen a radiación: la luz es dispersada por las partículas de acuerdo a su tamaño. La razón a la que la luz dispersada fluctúa en el tiempo (una función de D) se registra y se obtiene el correlograma de DLS [291]. Del perfil de las señales, se pueden conseguir diferentes datos. El tiempo al que la señal empieza a decaer significativamente da cuenta del tamaño promedio de las NPs. Por otra parte, una pendiente de curva más pronunciada corresponde a una muestra más monodispersa [291].

Dos síntesis fueron preparadas utilizando el procedimiento de Frank-Mirkin (sección 3.4.3 de la Metodología Experimental), obteniéndose AgNPs de 12.34 y 12.83 nm (medidos por TEM), así como 13.16 y 13.51 nm predichos por IT-SPME-Cap-LC (utilizando como señal la suma de las áreas de los dos picos). El error total de estimación fue de un 5.6%.

Los cromatogramas y los histogramas de las distribuciones de tamaños de dichas síntesis están representados en la **Figura 87** y **88** respectivamente. En la **Tabla 44** se proporcionan más parámetros sobre estas dos síntesis de AgNPs.

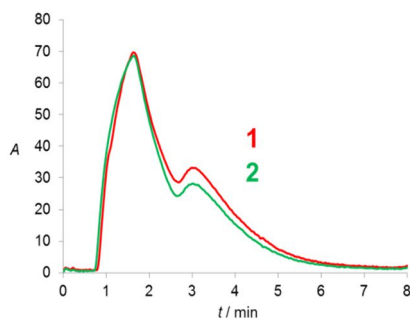


Figura 87. Cromatogramas en el método IT-SPME-Cap-LC-DAD para AgNPs de: (1) 12.34 nm y (2) 12.83 nm (dilución 1:16).

El próximo paso consistió en medir por DLS las dos síntesis en cuestión (12.34 y 12.83 nm). Los correlogramas se muestran en la **Figura 89 a**.

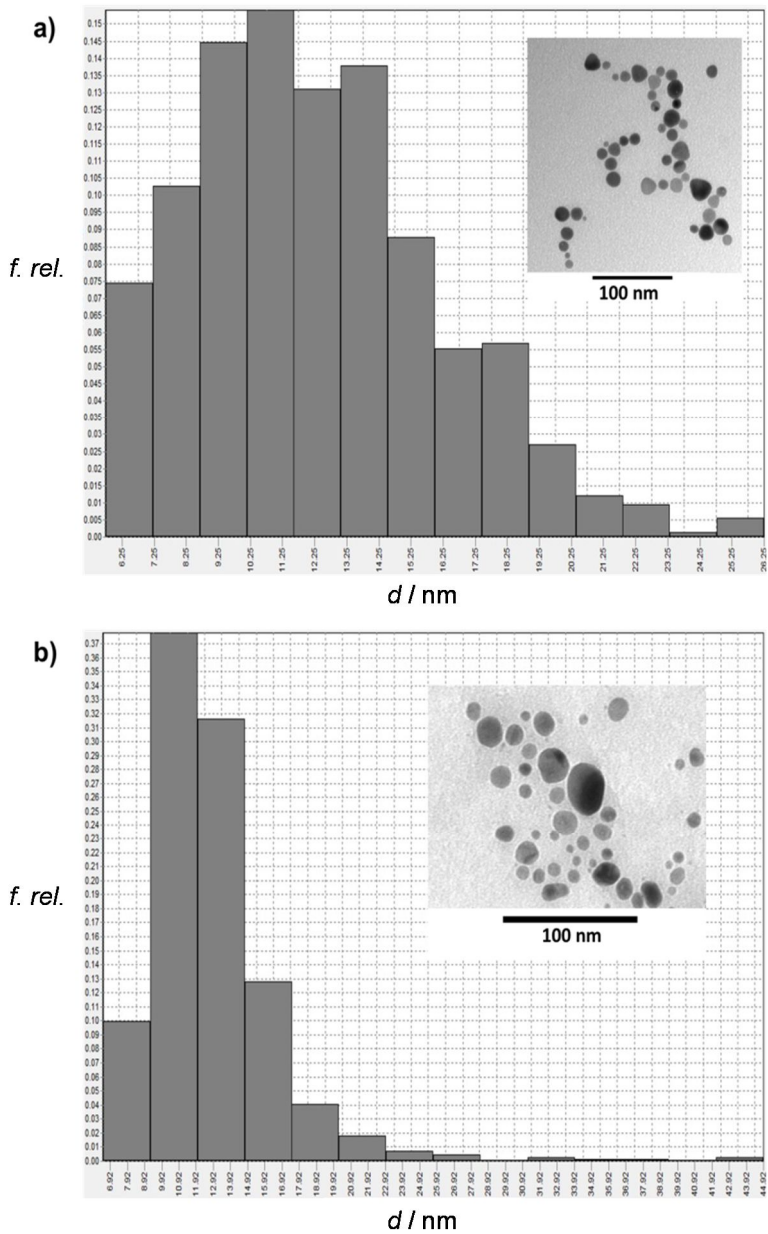


Figura 88. Histogramas de las distribuciones de tamaño obtenidos por TEM para AgNPs de: a) 12.34 y b) 12.83 nm. Arriba a la derecha: Imagen TEM.

La señal de la muestra con tamaños más pequeños de partícula ((1) en la **Figura 89 a**) decayó primero, lo que corrobora las medidas de TEM y de IT-SPME-Cap-LC-DAD; al mismo tiempo, ambas señales de DLS fueron comparables, por lo que los tamaños promedios son similares. La DLS predijo tamaños de alrededor de unos 17 nm, mayores que los obtenidos por las otras técnicas. Este hecho ha sido reportado antes en la literatura [292] ya que por DLS se estiman diámetros hidrodinámicos y no diámetros de núcleo metálico de NPs “deshidratadas” como en el análisis por TEM. Por otro lado, la polidispersidad de la muestra de partículas más pequeñas fue menor. De nuevo, el histograma obtenido por TEM de esta muestra corrobora este hecho (la distribución de tamaños fue más estrecha, ver **Figura 88**).

Tabla 44. Concentraciones y diluciones de las AgNPs procesadas por IT-SPME-Cap-LC-DAD (se inyectaron también diluciones 1:16).

d_{AgNPs} (nm) medido por TEM	[AgNPs] (nM) interpolada en Cap-LC	Dilución muestra	[AgNPs] (nM) final en Cap-LC
12.34	0.25	1:32	7.98
12.83	0.23	1:32	7.38

Dos experimentos adicionales fueron realizados. Primero, el patrón de AgNPs (síntesis de 17.32 nm) fue medido diluido y sin diluir (correlogramas en la **Figura 89 b**). El diámetro hidrodinámico permaneció prácticamente inalterado (disminuyó menos de 1 nm para la dilución acuosa). Este resultado implica que la capa superficial implicada en la polarización es pequeña y que sólo el método basado en la IT-SPME-Cap-LC es adecuado para evaluar este efecto. Adicionalmente, las AuNPs comerciales fueron ensayadas (ver **Figura 89 c**). Como se esperaba, la señal decayó después para NPs más grandes y también, el perfil del correlograma para las partículas de 5 nm mostró mayor polidispersión (presentaban un poco de agregación). Por consiguiente, una buena correlación entre las medidas por DLS y del método cromatográfico desarrollado fue obtenida.

Cabe discutir en este punto de comparación con otras técnicas, la diferencia entre el método desarrollado y los reportados en la bibliografía (hecho que se comentó en parte en la sección 7.1). En el método de la presente Tesis (específicamente su variante acoplada a la IT-SPME), se logra una separación en el sistema pero por polaridad (aunque ocurra un mecanismo de exclusión por tamaños, la variación de los tiempos de retención debida a este fenómeno es pequeña). Los métodos de la bibliografía han tenido por objetivo separar NPs por tamaño, siendo el estudio de Jiang y colaboradores el que ha ido más lejos logrando relacionar la anchura de la señal electroforética con el histograma obtenido por TEM. No

obstante, la IT-SPME-Cap-LC-DAD (y su variante sin IT-SPME) es un método pionero: no existe otro que apunte en la misma dirección y que consiga el mismo tipo de información (i.e. separación por polaridad, medidas de estabilidad, funcionalidad, análisis de NPs metálicas de diferente naturaleza y forma) manteniendo la relación de las señales con la [AgNPs].

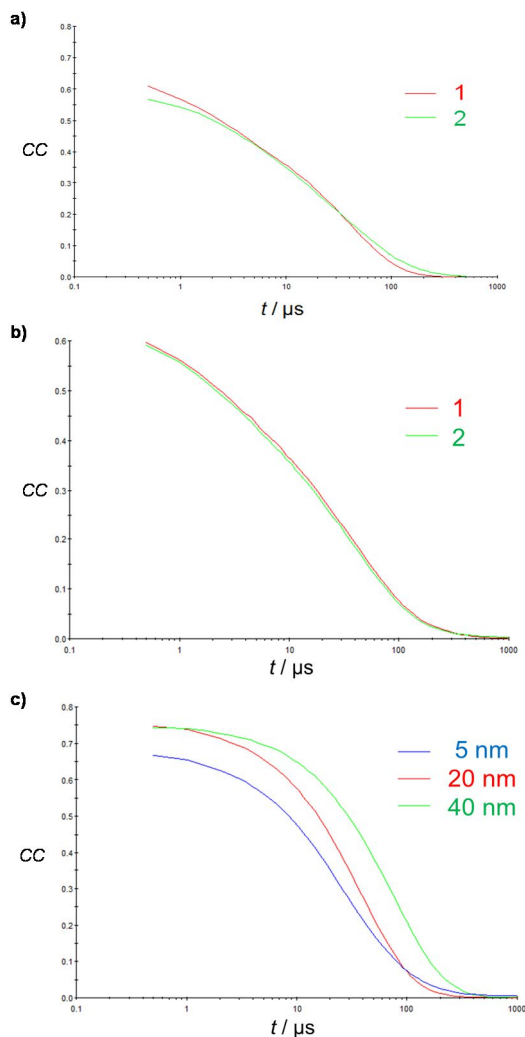


Figura 89. Correlogramas de DLS (CC, coeficiente de correlación, en el tiempo) para: a) AgNPs de (1) 12.34 y (2) 12.83 nm, b) AgNPs de 17.32 nm (1) diluidas y (2) sin diluir, y c) AuNPs de diferentes tamaños.

7.7.4 Dependencia de la señal con el diámetro hidrodinámico. Análisis de surfactantes.

Como se ha mencionado los surfactantes catiónicos cuaternarios (amónicos) inducen la agregación de las AgNPs por medio del efecto hidrofóbico [203]. En una dispersión de NPs, si se forman agregados más grandes, el número (y por ende, la concentración) de las partículas disminuye. Un análisis por TEM no es adecuado para estudiar este efecto debido a que las muestras se secan y se miden tamaños nucleares. Una muestra de AgNPs de 12.23 nm fue seleccionada para este estudio. Muestras sin diluir fueron expuestas a CTAB de 30 y 100 μM . Éstas (más una que no fue expuesta a CTAB) se inyectaron (volumen de inyección de 5 μL). Los resultados se pueden ver en la **Figura 90**. La señal en la IT-SPME-Cap-LC-DAD disminuyó de la misma forma que la concentración, mientras que el diámetro hidrodinámico aumentó como los correlogramas evidencian. Los tiempos de retención permanecieron prácticamente inalterados. Por lo tanto, el método propuesto responde a cambios en el tamaño hidrodinámico y puede ser utilizado para detectar surfactantes catiónicos (también se hizo el mismo experimento con BZKC consiguiéndose resultados similares), clasificados como ECs [6].

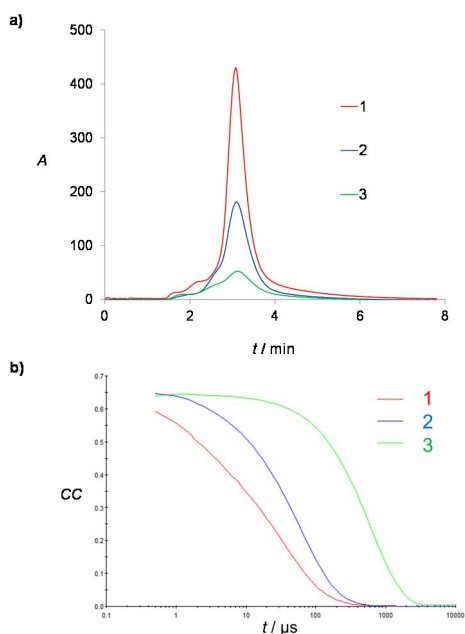


Figura 90. Estudio de surfactantes: a) cromatogramas y b) correlogramas para AgNPs de 12.23 nm en presencia de (1) 0, (2) 30 y (3) 100 μM de CTAB.

7.8 Conclusiones

Dos metodologías (Cap-LC-DAD e IT-SPME-Cap-LC-DAD) se han desarrollado con éxito para caracterizar NPs metálicas, pertenecientes al grupo de los ECs más recientes. En ambas estrategias, se ha demostrado que la señal cromatográfica responde a la concentración de las partículas. Los dos métodos propuestos no requieren etapas adicionales de pretratamiento de muestra, extracción o separación y proporcionaron buenos parámetros analíticos. La Cap-LC-DAD es una herramienta simple que puede utilizarse para estimar el diámetro de partícula promedio (a través de concentraciones, errores relativos inferiores al 5%) para síntesis de AgNPs (esféricas como potencialmente, no esféricas), así como también para estudiar propiedades relativas a estabilidad y funcionalidad de las partículas. Además, sólo se requiere un patrón de NPs para la calibración.

El método de IT-SPME-Cap-LC-DAD (nunca antes empleado en este tipo de determinaciones) va aún más lejos. Además de aumentar la sensibilidad, el efecto del dispersante (i.e. agua) puede ser estudiado ya que las partículas en dispersión se distribuyen de acuerdo a su polaridad. Las NPs que no son polarizadas interaccionan con la fase adsorbente del capilar por medio del efecto hidrofóbico y las partículas polarizadas por el agua a través de un mecanismo por exclusión de tamaños principalmente. La razón entre las señales de los diferentes picos puede usarse como un parámetro característico para concebir rápidamente una idea de los tamaños de las NPs (ya que la magnitud del efecto del agua es proporcional al tamaño de NP de no sólo AgNPs, sino también de AuNPs y presumiblemente de otras partículas esféricas), y así controlar esta propiedad en un procedimiento de síntesis de un laboratorio o comparar muestras distintas. Finalmente, se obtuvo una buena correlación entre las medidas del método desarrollado y la DLS. La IT-SPME-Cap-LC-DAD también responde a los cambios de los diámetros hidrodinámicos de las partículas y puede ser utilizada potencialmente para detectar otros ECs, e.g. surfactantes catiónicos.

Ambas metodologías constituyen avances en el campo de la caracterización de NPs (emblemáticos ECs) y considerando que aún pueden ser perfeccionadas, se pueden esperar más resultados prometedores en el futuro cercano.

Capítulo 8.

AgNPs en suelos

8.1 Análisis de AgNPs en suelos, una matriz compleja

Como se ha descrito en la sección 1.5.3.1 de la Introducción, las AgNPs pueden llegar a los suelos por contaminación directa o indirecta [169-171] y estando en esta matriz, las partículas pueden ser fuertemente adsorbidas dependiendo de las propiedades específicas del suelo en cuestión. La probabilidad de que dicha contaminación ocurra aumenta día a día ya que las AgNPs ven su uso incrementado progresivamente [145], utilizándose en aplicaciones diversas [157,158,293,294] como ya se ha comentado con anterioridad.

Por su parte, los suelos son matrices muy complejas: factores estructurales como la textura (i.e. el arreglo de espacio de partícula en un suelo) y la distribución de tamaño de partícula (PSD, i.e. la composición del tamaño del grano de suelo) determinan sus propiedades físico-químicas [295]. A su vez, estos factores dependen de la composición mineral, la naturaleza química, la humedad, el contenido salino, entre otras propiedades. En consecuencia, el número de parámetros involucrados es elevado. Considerando la interacción AgNPs-suelo, la PSD puede ser vista fácilmente como una variable crucial ya que condiciona directamente el tamaño de la superficie de contacto entre ellos. También, el contenido de materia orgánica del suelo (SOM, compuesto de fracción residual, celulosa, ácidos húmicos y fúlvicos) puede jugar un papel importante en la retención de NPs en el suelo.

Adicionalmente, ha sido documentado que la SOM (específicamente, los ácidos húmicos, HAs) promueven la formación de AgNPs bajo condiciones determinadas [296], por lo que se podrían esperar interacciones entre estas sustancias. Por otra parte, la superficie cargada del suelo puede afectar la retención de las NPs permitiendo más o menos movilidad de las partículas si las AgNPs poseen cargas iguales u opuestas a la del suelo comprometido (e.g. las AgNPs con capping de citrato están cargadas negativamente en la superficie y se quedarían más adsorbidas en un suelo positivamente cargado) [297]. En resumen, la naturaleza particular de un suelo induce una manera única de interactuar con las AgNPs debido al gran número de factores involucrados.

Diferentes estrategias se pueden adoptar para caracterizar la interacción entre las AgNPs y un suelo. No obstante, como se ha recalcado en capítulos precedentes, la mayoría de los métodos analíticos cuantifica a las partículas de manera indirecta a través de su contenido en plata. En el presente estudio, se ha de seleccionar un método que responda a una característica propia de las NPs que, por un lado, experimente cambios en presencia del suelo lo que resulte en una medida directa de la adsorción producida y por otro, cuya respuesta sea proporcional a [AgNPs].

Una de las metodologías propuestas en la literatura es el análisis TEM que, como se ha discutido en el Capítulo 7 principalmente, puede utilizarse para determinar la concentración

de las partículas a través de la medida del d_{AgNPs} [189]. Pero este método presenta ciertos inconvenientes. Primero y para realizar dicha estimación, las síntesis deben haber sido obtenidas con un 100% de rendimiento (en el Capítulo 6, se ha propuesto un método colorimétrico que puede utilizarse para controlar este aspecto). Segundo, una variación de concentración es altamente difícil de estimar ya que un número específico y bajo de partículas debe ser contado (500, siempre menor al total) para determinar $[\text{AgNPs}]$. Al menos que el tamaño promedio de las partículas cambie, la concentración calculada siempre será la misma.

En el Capítulo 7, se propusieron dos métodos para determinar AgNPs en matrices acuosas: la Cap-LC-DAD y la IT-SPME-Cap-LC-DAD, cuyos montajes se describen en la sección 3.3.2.1 (ver **Figuras 43 a y b**) de la Metodología Experimental (las condiciones experimentales de dichos métodos se discuten en la sección 3.5 del mismo capítulo). En ellos, se mide la SPRB, una característica específica de las NPs metálicas (en este caso, de las AgNPs) [173]. Se demostró que ambos métodos responden a la concentración de AgNPs, contrario a las medidas directas por espectrofotometría UV-Vis en donde la señal se ve afectada por otros parámetros (e.g. formas, estados de agregación). Por consiguiente, estas dos metodologías fueron seleccionadas para caracterizar la interacción AgNPs-suelo. En este momento, es oportuno recalcar que para el estudio en cuestión no hace falta conocer los tamaños de las partículas (se utilizará el d_{AgNPs} solamente para efectos de calibración), sino las variaciones de concentración de las mismas para evaluar la intensidad de la retención.

Para conseguir el objetivo del presente estudio (i.e. cuantificar la interacción AgNPs-suelo por medio de un porcentaje de retención de las partículas en esta matriz), dispersiones de NPs fueron mezcladas con un suelo en particular y estudios se llevaron a cabo en los sobrenadantes después de que las muestras fueran debidamente procesadas. Esto significa que los métodos desarrollados en el Capítulo 7 (así como el desarrollado en el Capítulo 6, que permite asegurar los rendimientos cuantitativos de las síntesis) se pueden emplear de la misma forma (salvo alguna excepción puntual en cuanto a condición experimental) debido a que se tratarán muestras acuosas. Este estudio se complementará con el análisis por microscopía de los suelos puestos en contactos con las NPs. Para este efecto, suelos de distinto origen fueron escogidos para estudiar la adsorción de las AgNPs en ellos y establecer relaciones entre las propiedades físico-químicas de los mismos (e.g. SOM y PSD) y la intensidad de la retención.

8.2 Muestras de suelos y procedimientos de contaminación

Se seleccionaron muestras de suelos de distinto origen: compost, monte, huerto y urbano. Una cantidad de muestra (0.1 g) se mezcló con AgNPs (un patrón), un blanco de síntesis de AgNPs o agua (1 mL) constituyendo tres series (dichas series o las muestras individuales denominadas A, SB y W). Luego, alícuotas de los sobrenadantes de cada serie

se tomaron cada cierto tiempo, se centrifugaron y se hicieron pasar por una jeringa con filtro de 0.45 μm (PTFE), obteniéndose las muestras finales. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Para mayor información, ver el Anexo 9.

8.3 Caracterización de las sustancias

8.3.1 Patrón de AgNPs

La síntesis de AgNPs (considerada como patrón) se preparó siguiendo el método de Frank-Mirkin [239,240] detallado en la sección 3.4.3 de la Metodología Experimental. Su rendimiento fue cuantitativo confirmado por el método de la TMB (explicado en el Capítulo 6). Para los blancos de síntesis, el mismo procedimiento fue realizado, pero esta vez sin añadir AgNO_3 a la mezcla.

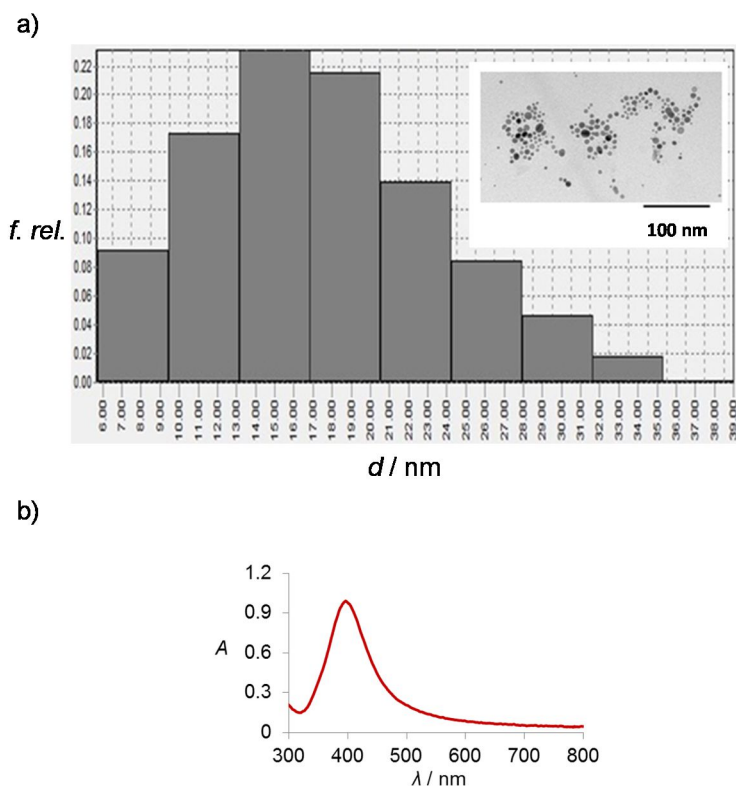


Figura 91. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 17.3 nm. a) Histograma de distribución tamaño de partícula e imagen (arriba a la derecha) obtenidos por TEM. b) Espectro UV-Vis para una dilución 1:8.

La caracterización se llevó a cabo por TEM y UV-Vis (secciones 3.2.2.2 y 3.2.1.1 de la Metodología Experimental). El d_{AgNPs} obtenido por TEM fue de 17.3 nm. La **Figura 91** muestra tanto el histograma de las distribuciones de tamaños (obtenido por análisis de TEM) como el espectro UV-Vis (dilución 1:8) de la síntesis. Como era de esperarse, el máximo de absorbancia se encontró alrededor de los 400 nm (correspondiente a la longitud de onda máxima de la SPRB). Este patrón fue utilizado en todos los experimentos del presente estudio.

8.3.2 Muestras de suelos

La espectroscopía IR (ver sección 3.2.1.4 de la Metodología Experimental, accesorio ATR-FTIR) fue escogida para caracterizar las muestras de suelo. Las muestras fueron medidas directamente en el equipo. En la **Figura 92** se representan los espectros IR de cada muestra.

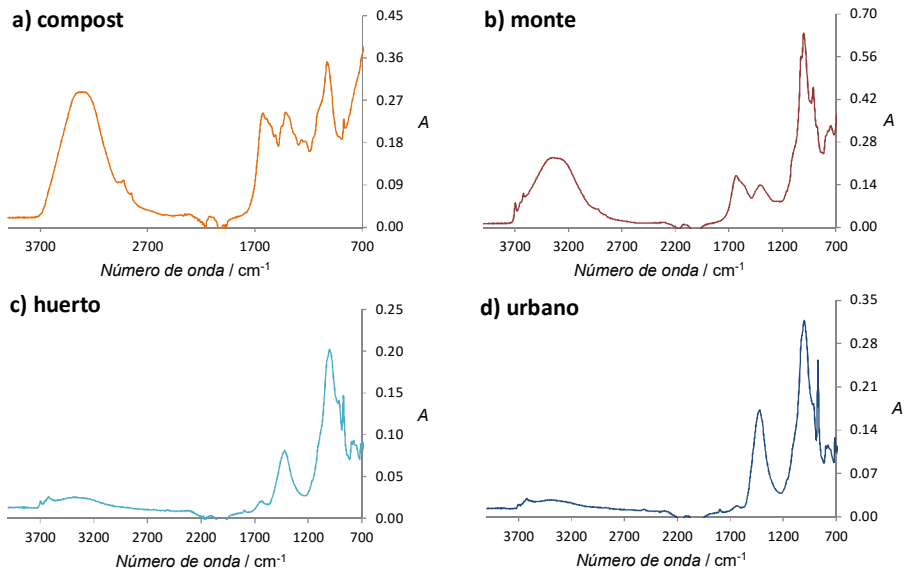


Figura 92. Caracterización de los suelos. Espectros IR para los 4 suelos estudiados obtenidos por ATR-FTIR.

Dos grupos pudieron ser establecidos: en el primero (compost y monte) y además de las bandas C-O y Si-O (1430 y 1030 cm^{-1} respectivamente), vibraciones compatibles con la materia orgánica pudieron distinguirse (vibraciones O-H, C-H y C=O en la zona de

alrededor de 3200 y 3700 cm^{-1}), debido seguramente a la presencia de SOM (principalmente, HAs); en el segundo (huerto y urbano), se encontraron también las bandas C-O y Si-O (comúnmente asociadas a la presencia de carbonatos y arcillas), pero la presencia de materia orgánica fue menos importante (siendo, para el suelo de huerto la más baja).

Por otra parte, las muestras de suelo (1.0 g) fueron tamizadas para controlar la PSD en cada una de ellas. En la **Tabla 45** se muestra la composición promedio para los 4 suelos estudiados en términos de 5 fracciones: bajo 100 μm , 100-200 μm , 200-300 μm , 300-400 μm y fracción gruesa (i.e. sobre 400 μm).

Tabla 45. PSD (distribución del tamaño de partícula). Porcentajes (%) de cada fracción para los 4 suelos estudiados.

Fracción	Compost	Monte	Huerto	Urbano
< 100 μm	8.95	3.94	17.80	18.67
100-200 μm	75.26	15.92	22.68	21.59
200-300 μm	14.27	14.02	14.55	19.58
300-400 μm	0.80	16.13	13.36	11.59
> 400 μm^a	0.74	49.99	31.61	28.57

^aFracción gruesa

Para una mejor comparativa visual, la **Figura 93** muestra un gráfico de barras por fracción para los 4 suelos de manera simultánea además de imágenes obtenidas por microscopía óptica (metodología descrita en la sección 3.2.2.1). Si los 2 grupos establecidos por el análisis ATR-FTIR se consideran, se puede afirmar que: para el primero, el suelo compost tiene partículas más pequeñas que el de monte; en tanto que en el segundo, ambos suelos (huerto y urbano) tienen composiciones similares.

Como alternativa a obtener la PSD por tamizado y posterior pesada (un trabajo laborioso), en este trabajo se propone adicionalmente una metodología basada en la microscopía óptica haciendo uso del software del equipo lo que acorta los tiempos del análisis y otorga resultados comparables (este procedimiento es útil tanto para suelos como para sedimentos).

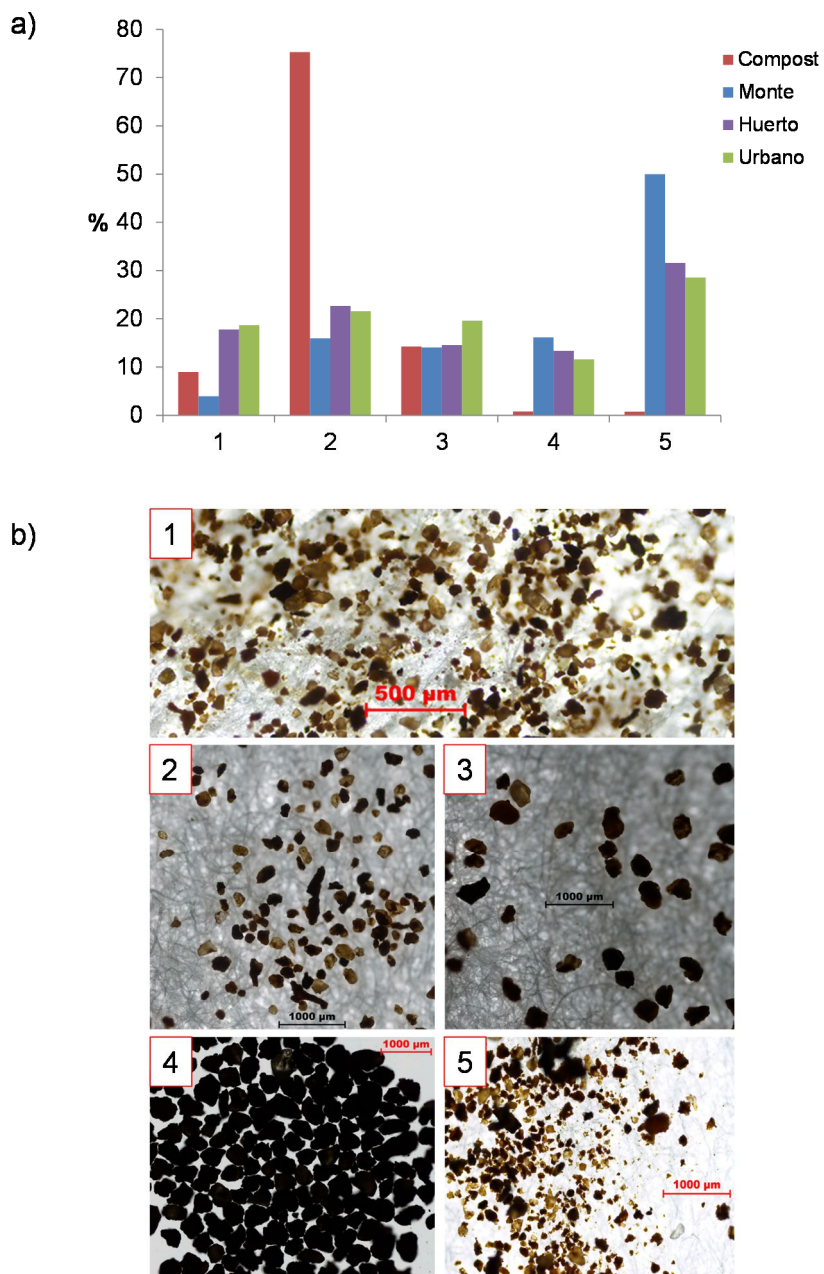


Figura 93. Caracterización de los suelos. a) Gráfico de barras para la PSD en cada suelo e b) imágenes de microscopía óptica para cada fracción del suelo huerto tamizado: (1) bajo 100 μm , (2) 100-200 μm , (3) 200-300 μm , (4) 300-400 μm , (5) sobre 400 μm .

8.3.3 Caracterización de la PSD de suelos por microscopía óptica

Opcionalmente, se pueden caracterizar suelos y sedimentos empleando la microscopía óptica (equipo Eclipse). A manera ilustrativa, se analizará una muestra de suelo mezcla (combinando las 4 muestras del estudio de forma aleatoria). El procedimiento es el siguiente: se toma una imagen por microscopía óptica (el equipo permite procesar zonas amplias por superposición de capturas). El software permite también conseguir el histograma de distribución de tamaños de partícula (similar a ImageJ).

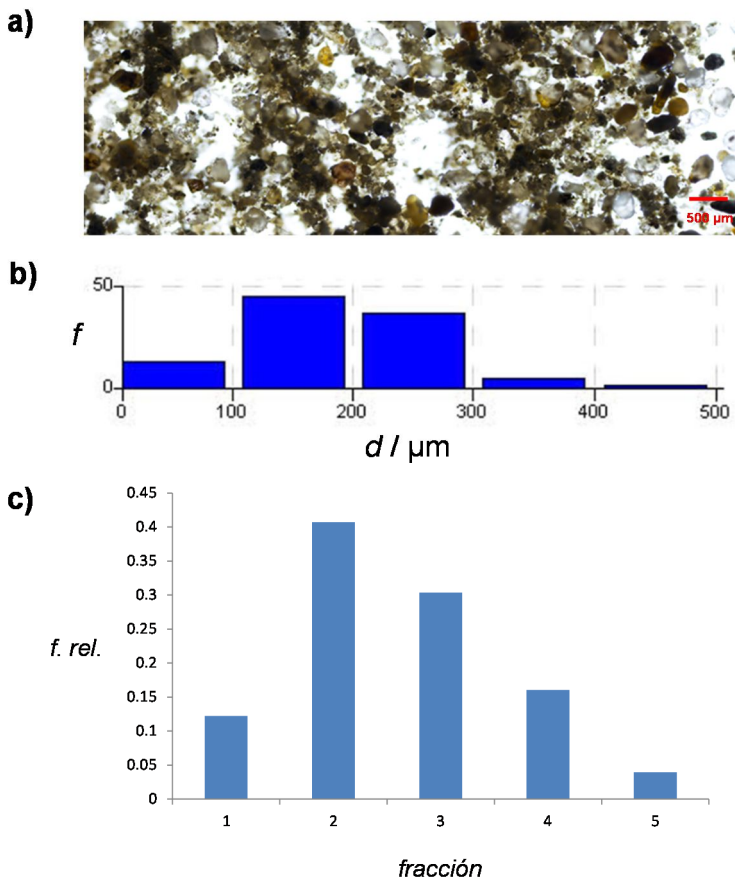


Figura 94. Caracterización de suelos por microscopía óptica. a) Imagen de una muestra de suelos (mezcla) de microscopio óptico Eclipse (escala 500 µm). Histogramas de distribución de tamaños obtenidos por: b) microscopía óptica (f: frecuencia) y c) tamizado-pesada de las diferentes fracciones: (1) bajo 100 µm, (2) 100-200 µm, (3) 200-300 µm, (4) 300-400 µm, (5) sobre 400 µm.

En la **Figura 94 a** se puede ver la imagen procesada para esta muestra. Los histogramas de la distribución de tamaños de las partículas (i.e. la PSD) obtenidos tanto por microscopía óptica como por el proceso de tamizado-pesada son similares como se puede apreciar en las **Figuras 94 b y c**. La ventaja del método microscópico es que disminuye la manipulación por parte del operador.

8.4 Estudios preliminares

Habiendo comentado la estrategia para contaminar suelos (sección 8.2), la siguiente etapa consistió en estudiar posibles interferencias que se pueden extraer desde el suelo en el sobrenadante alterando las medidas espectrofotométricas de la detección de los métodos cromatográficos. 3 muestras de suelo (el suelo de huerto fue seleccionado) se contaminaron con NPs, blanco de síntesis y agua (A, SB y W) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Después de 60 min, una alícuota de sobrenadante de cada muestra se midió por espectrofotometría UV-Vis. Como se aprecia en la **Figura 95 a**, para SB y W, las muestras absorbieron a 400 nm (sobrenadantes de color amarillento). Por lo tanto, un compuesto interferente se extrajo con el agua o el blanco de síntesis (en este caso, en mayor proporción). Por otra parte, para A, la SPRB se alteró ya que el interferente (como será llamado de aquí en adelante, aun si pudiesen ser varias especies químicas diferentes) también fue extraído cuando las AgNPs se mezclaron con el suelo. Considerando el perfil espectral resultante, debe confirmarse si la señal UV-Vis obtenida es la suma de la absorción debida a las AgNPs y al interferente y no el espectro de nuevas especies formadas en el proceso.

Se realizó el siguiente experimento: adiciones sucesivas de AgNPs se añadieron a una alícuota de sobrenadante contaminada con blanco de síntesis (alícuota o muestra SB). En términos de perfil de señal, el espectro resultante se correspondió bien con el obtenido para la alícuota de sobrenadante contaminada con AgNPs (alícuota o muestra A). Por consiguiente, tanto las NPs como el interferente estaban presentes en la muestra A y sus absorbancias son aditivas. Las imágenes TEM para esta muestra evidencian la presencia de AgNPs (ver **Figura 95 b**). Los espectros UV-Vis de esta experiencia así como la SPRB de las NPs utilizadas se muestran en las **Figuras 95 c y d** respectivamente.

Adicionalmente y teniendo en cuenta que el reactivo mayoritario de las síntesis de AgNPs es citrato trisódico, una cantidad de suelo se mezcló con una disolución de citrato. Después de 1 h, una alícuota del sobrenadante se midió por espectrofotometría UV-Vis. Comparado al espectro obtenido del sobrenadante resultante de la puesta en contacto del blanco de síntesis con el suelo, se puede afirmar que el citrato promueve la extracción del interferente. Los resultados se presentan en la **Figura 96**.

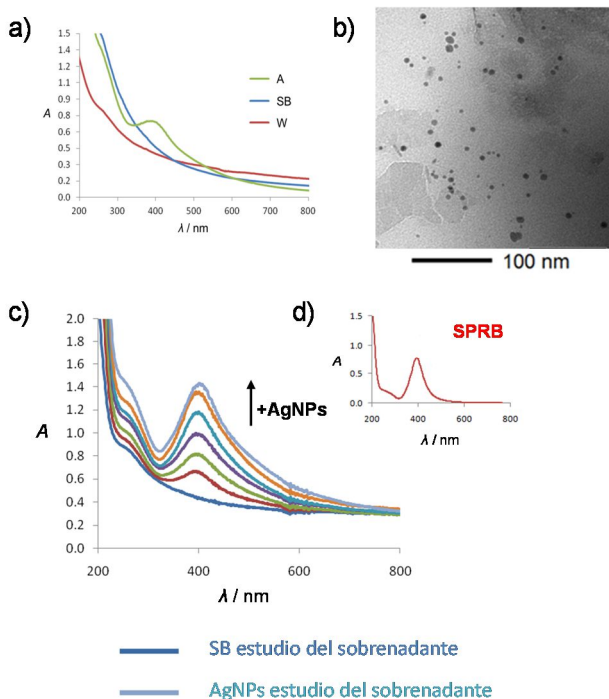


Figura 95. a) Espectros UV-Vis de los sobrenadantes después de contaminar muestras de suelo con: (A) AgNPs, (SB) blanco de síntesis y (W) agua. b) Imagen de TEM del sobrenadante contaminado con AgNPs. c) Espectros UV-Vis de adiciones sucesivas de AgNPs sobre el sobrenadante contaminado con el blanco de síntesis (SB). d) Espectro UV-Vis que muestra la SPRB de la síntesis de AgNPs utilizada.

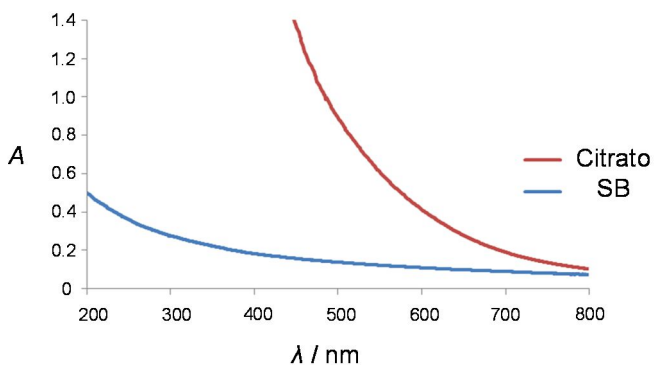


Figura 96. a) Espectros UV-Vis de los sobrenadantes de disoluciones mezcladas con suelo de: (SB) blanco de síntesis y (citrato) citrato trisódico.

En este punto, habiendo confirmado la presencia de un interferente en los diferentes sobrenadantes, el método de Cap-LC-DAD (sin IT-SPME) fue seleccionado para analizar rápidamente la tasa de extracción de este compuesto en el tiempo (series temporales) en los 4 suelos estudiados y así adoptar una estrategia para evitar las interferencias.

8.5 Estudios por Cap-LC-DAD: series temporales A, SB y W

Como se comentó en la sección 8.1, se utilizó el mismo sistema que en el capítulo anterior. La válvula empleada fue de volumen fijo (2 μ L) y la fase móvil consistió en una disolución acuosa de SDS (10 mM), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 mM) y AcNH_4 (10 mM).

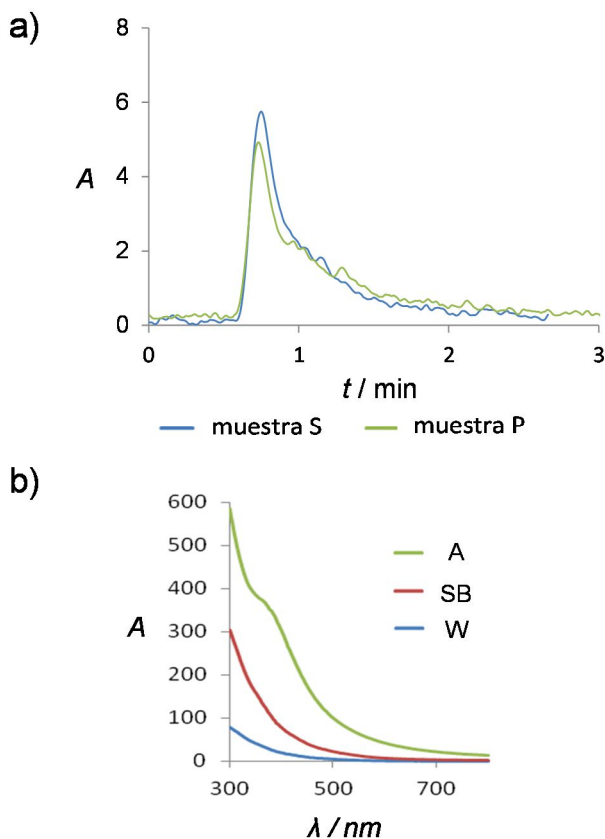


Figura 97. Estudios en Cap-LC-DAD. a) Cromatogramas para muestras de AgNPs: (muestra S) sin procesar y (muestra P) procesadas (dilución 1:8). b) Espectros DAD de los picos obtenidos (en el máximo) en las 3 series (A, SB y W) para los 4 suelos (en este caso, medidos en cromatogramas de las series para el suelo de huerto).

Teniendo en cuenta que las muestras se procesan según lo descrito en la sección 8.2, las AgNPs podrían cambiar después de las operaciones efectuadas. Por lo tanto y en primer lugar, se debe estudiar la variabilidad entre AgNPs procesadas y no procesadas en términos de respuesta en el sistema cromatográfico. Una muestra de AgNPs (dilución 1:8) se inyectó antes y después del procedimiento. Los resultados se pueden observar en la **Figura 97 a**. Las señales no variaron significativamente: aunque el perfil de pico no fuese idéntico, el área de pico (la señal analítica escogida en el método) permaneció virtualmente inalterada.

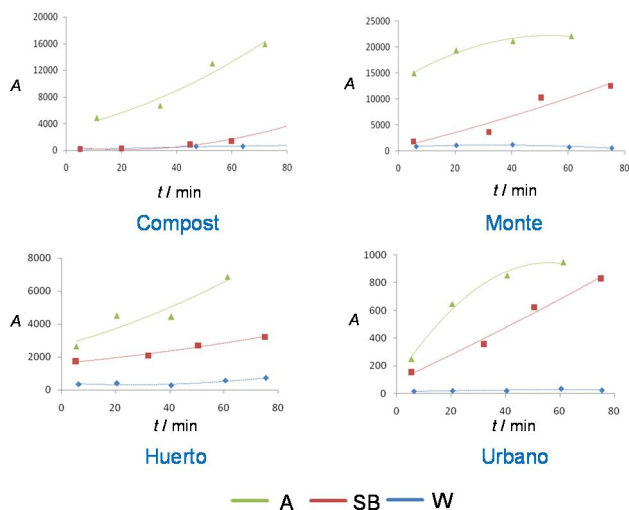


Figura 98. Estudios en Cap-LC-DAD. Variación de las señales cromatográficas en el tiempo (rango 0-80 min) para las 3 series (A) AgNPs, (SB) blanco de síntesis y (W) agua en cada uno de los 4 suelos.

El próximo paso fue estudiar la interferencia de la metodología. Siguiendo el procedimiento de contaminación de muestras, 3 series (A, SB y W) para cada suelo que consistían en alícuotas de los sobrenadantes tomadas a tiempos diferentes en un rango de 0-80 min se inyectaron en el sistema sin dilución. En Cap-LC, sólo se obtiene un pico cromatográfico (Capítulo 7), por lo que no se esperaría separación entre las NPs y el interferente. Este hecho fue confirmado por los espectros DAD (ver **Figura 97 b**) del pico obtenido en las series A, SB y W (los espectros se correspondieron de buena forma para las series de los diferentes suelos). Los perfiles espectrales fueron comparables a los conseguidos en el análisis UV-Vis (ver **Figura 95 a**) y para la serie A, el espectro corresponde a la suma de los compuestos involucrados (i.e. NPs e interferente).

No obstante, como la dispersión de AgNPs siempre fue la misma (para todos los suelos ensayados) se puede obtener información sobre la extracción del interferente. En la **Figura 98** están representadas las variaciones temporales de la señal analítica para las 3 series en cada suelo. Diversos aspectos pueden ser discutidos. En los 4 suelos, los valores más altos y más bajos de señal se obtuvieron para las series A y W respectivamente dado a la presencia de NPs en A y a que la extracción del interferente es promovida por la matriz de la síntesis. La magnitud de esta extracción es diferente dependiendo de la naturaleza del suelo, siendo en orden creciente: urbano, huerto, compost y monte. A la vista de esto, se puede establecer una relación ya que en los dos suelos en donde la extracción fue en una mayor proporción (compost y monte) son los que contenían mayor cantidad de SOM (ver sección 8.3.2). Por ende, la naturaleza del interferente podría ser orgánica (presumiblemente, HAS). Es más, si se toman en cuenta las series A, se pueden establecer dos grupos de acuerdo a si se alcanzó un valor máximo de señal (urbano y monte) o no (huerto y compost).

En todos los casos, como la interferencia es importante, una estrategia diferente debe ser adoptada para poder lograr el objetivo de cuantificar la interacción entre las AgNPs y el suelo (esto, en las series A): o bien, separando ambos compuestos (AgNPs y el interferente) o eliminando (física o químicamente) uno de ellos.

8.6 IT-SPME-Cap-LC-DAD

8.6.1 Calibración

Cuando la IT-SPME se acopla a la Cap-LC (Capítulo 7), no sólo se incrementa la sensibilidad (mayor volumen de muestra es procesado), sino también las partículas dispersas en agua (como en el presente estudio) se separan por polaridad en dos grupos, mientras se mantiene la dependencia de las señales con la [AgNPs] (como en el método Cap-LC-DAD). Por lo mismo, se puede esperar que algunas AgNPs se separen dependiendo de la respuesta del interferente en el método de IT-SPME-Cap-LC-DAD.

En primer lugar, la respuesta de la síntesis de AgNPs utilizada se evaluó por IT-SPME-Cap-LC-DAD para comprobar la linealidad inyectando diluciones de este patrón. 30 μL de muestra fueron inyectados y un capilar de PDMS TRB-35 de 70 cm fue seleccionado (montaje del sistema en la sección 3.3.2.1 de la Metodología Experimental). El sistema fue el mismo al utilizado en el capítulo anterior (también se empleó una columna Jupiter C18). Se realizó la calibración con el patrón y sus diluciones. Para cada inyección, se obtuvieron dos picos y la señal analítica escogida fue la suma de las dos áreas. La curva de calibrado (área total vs [AgNPs]) puede verse en la **Figura 99**. Para el cálculo de las concentraciones a partir del d_{AgNPs} utilizó la fórmula adaptada de la bibliografía (eq 1):

$$(1) d_{AgNPs} = \left(\frac{[Ag^+] \cdot d_{Ag}^3}{[AgNPs]} \right)^{1/3}$$

donde d_{AgNPs} , d_{Ag} , $[AgNPs]$ y $[Ag^+]$ corresponden al diámetro promedio de las partículas, diámetro atómico de la plata (0.289 nm), concentraciones de AgNPs y de plata inicial (como Ag^+ de $AgNO_3$) respectivamente.

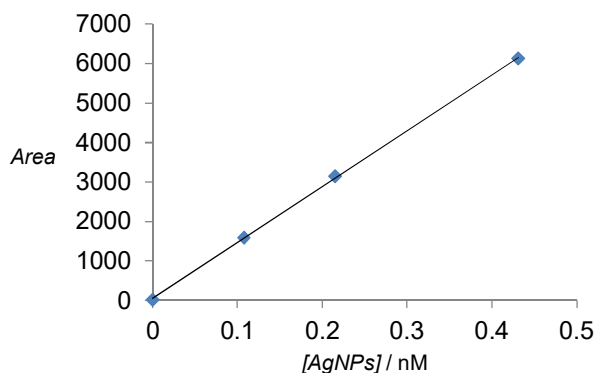


Figura 99. Calibración para el método IT-SPME-Cap-LC-DAD utilizando como patrón una síntesis de AgNPs de 17.3 nm y sus diluciones.

La linealidad fue excelente ($R^2 = 0.9998$) y la pendiente (14145 nM^{-1}) comparable a la del estudio anterior, así como también la precisión ($RSD = 7\%$). El LOD y $S_{y/x}$ fueron 0.009 nM y 45.5 respectivamente. La dilución de trabajo escogida fue de 1:16 (correspondiente a 0.22 nM) para las experiencias posteriores.

8.6.2 Estudios de suelos

Se realizaron los procedimientos de contaminación con AgNPs y blanco de síntesis (obteniéndose los sobrenadantes que serán referidos como muestras A y SB respectivamente) para los 4 suelos estudiados como en las series temporales, pero esta vez fijando el tiempo de contacto en 60 min (tiempo en que se alcanzó el valor máximo de extracción para los suelos urbano y de monte).

Cuando se inyectaron, las muestras A de los 4 suelos, dos picos fueron obtenidos (para compost y monte, el segundo pico fue muy bajo). El primer pico correspondió a un grupo

conteniendo a las NPs y el interferente; el segundo pico, a NPs. En vista de estos resultados, se podría adoptar la estrategia siguiente: considerar sólo el segundo pico para el análisis. Sin embargo, la variedad de especies químicas presentes en la matriz de un suelo podría interferir en la distribución de las NPs en los dos grupos induciendo a error en las estimaciones (aún, cuando observaciones cualitativas puedan hacerse). Por esta razón, se decidió destruir químicamente a las AgNPs (desestabilizándolas, alterando la absorbancia a 400 nm, i.e. la SPRB), ya que la naturaleza del interferente no ha sido claramente elucidada.

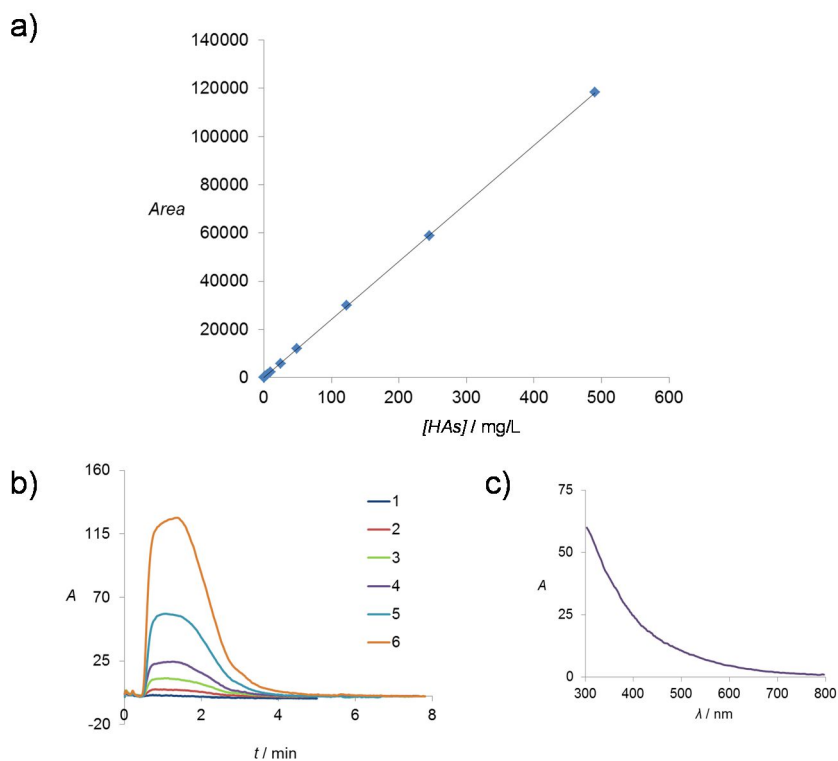


Figura 100. a) Curva de calibrado en IT-SPME-Cap-LC-DAD para los HAs en un rango entre 0-500 mg/L. b) Cromatogramas obtenidos para patrones con [HAs] de: (1) 0.5, (2) 2, (3) 5, (4) 10, (5) 25 y (6) 50 mg/L. c) Espectro DAD para (4).

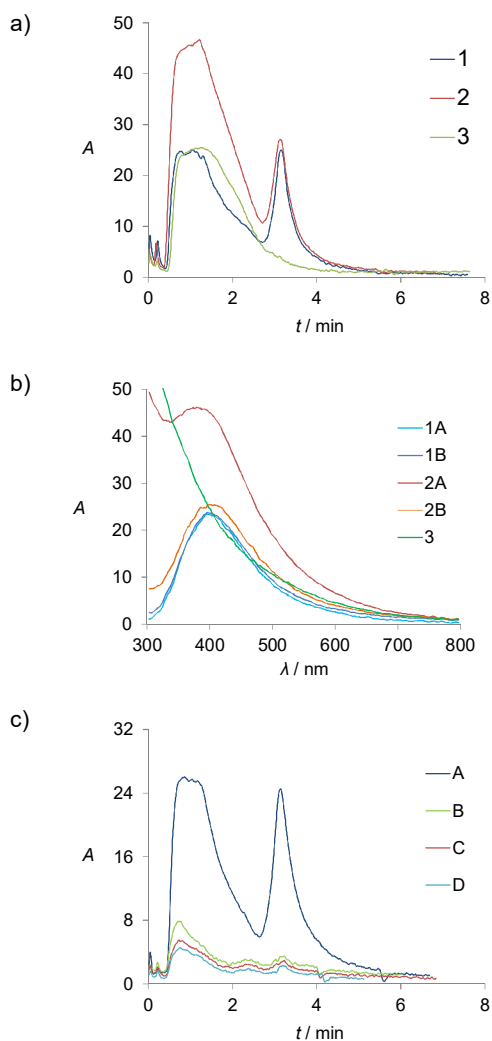


Figura 101. a) Cromatogramas para: (1) AgNPs (dilución 1:16), (2) muestra A (dilución 1:16, suelo de huerto) y (3) patrón de HAs (10 mg/L). b) Espectros DAD para: (1A) primero y (1B) segundo pico de las AgNPs, (2A) primero y (2B) segundo pico de la muestra A y (3) primer pico del patrón de HAs. c) Cromatogramas para AgNPs: (A) en ausencia, y en presencia de Na₂S₂O₃ (1%) después de (B) 40, (C) 45 y (D) 50 min de reacción.

Al mismo tiempo, se hicieron estudios con patrones de HAs (probablemente compuestos responsables de la interferencia). El calibrado correspondiente, los cromatogramas para 6 niveles de concentración y el espectro DAD de los HAs se pueden

ver en la **Figura 100** (las disoluciones presentaron tonalidad amarilla). Los HAs responden linealmente en un amplio rango de concentraciones ($R^2 = 0.99997$) y los cromatogramas presentan sólo un pico cromatográfico con un espectro DAD que se corresponde a los obtenidos para las señales en Cap-LC de las series SB (ver **Figura 97 b**, línea roja). Si los cromatogramas y espectros DAD de la muestra A (para suelo de huerto por ejemplo, **Figuras 101 a y b** respectivamente), AgNPs y HAs se comparasen, los resultados muestran que existe una alta probabilidad de que el componente principal de la interferencia fuera HAs (tanto la señal cromatográfica como el espectro DAD del primer pico para la muestra A pueden ser considerados como la suma de las contribuciones de AgNPs y HAs).

Experimentalmente, se encontró que una alta concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1% (p/v)) rápidamente alteraba la SPRB de las AgNPs. Es más, este reactivo no afectaba la absorción del interferente en las muestras SB. En consecuencia, se realizó el experimento siguiente para cuantificar la adsorción de partículas en los 4 suelos ensayados: primero, un estudio cinético de la desestabilización de la SPRB con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ debe ser hecho por IT-SPME-Cap-LC para saber el tiempo en que las NPs son destruidas (o un porcentaje conocido de ellas); segundo, las muestras A (y muestras SB para confirmar que la señal debida al interferente no cambia) de los 4 suelos deben ser medidas antes y después de añadir $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (esperando el tiempo estimado en la primera etapa) para poder determinar la cantidad de AgNPs que está en el sobrenadante y por diferencia, las partículas retenidas en cada suelo.

Para el estudio cinético, las AgNPs fueron inyectadas directamente y en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%) a diferentes tiempos controlados. La **Figura 101 c** presenta los cromatogramas después de 40, 45 y 50 min de reacción en los cuales la destrucción de NPs se estimó en 86, 89 y 90% (después de 50 min, las señales no disminuyeron significativamente). Por lo tanto, las muestras A (y SB) pueden ser medidas después de 50 min de haber sido mezcladas con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y si la absorción a 400 nm decrece, esta variación representará un 90 % de la señal inicial (un valor que puede ser utilizado para corregir los resultados).

Los resultados del estudio con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en muestras A y SB para los 4 suelos se muestran en la **Figura 102**. Comparando los cromatogramas obtenidos para las muestras A en ausencia y presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (**Figuras 102 a y b** respectivamente), se aprecia que las señales permanecen inalteradas para los suelos compost y de monte y que decrecieron en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para los suelos de huerto y urbano (ambos presentaban el segundo pico en las muestras A, indicativo de la presencia de NPs). Para el suelo de huerto, las señales fueron más altas. En cuanto a las muestras SB, las áreas de pico en ausencia (**Figura 102 c**) y en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (**Figura 102 d**) no cambiaron significativamente (menos de 3%, valor satisfactorio considerando el RSD del método), aunque los perfiles lo hicieran en menor medida.

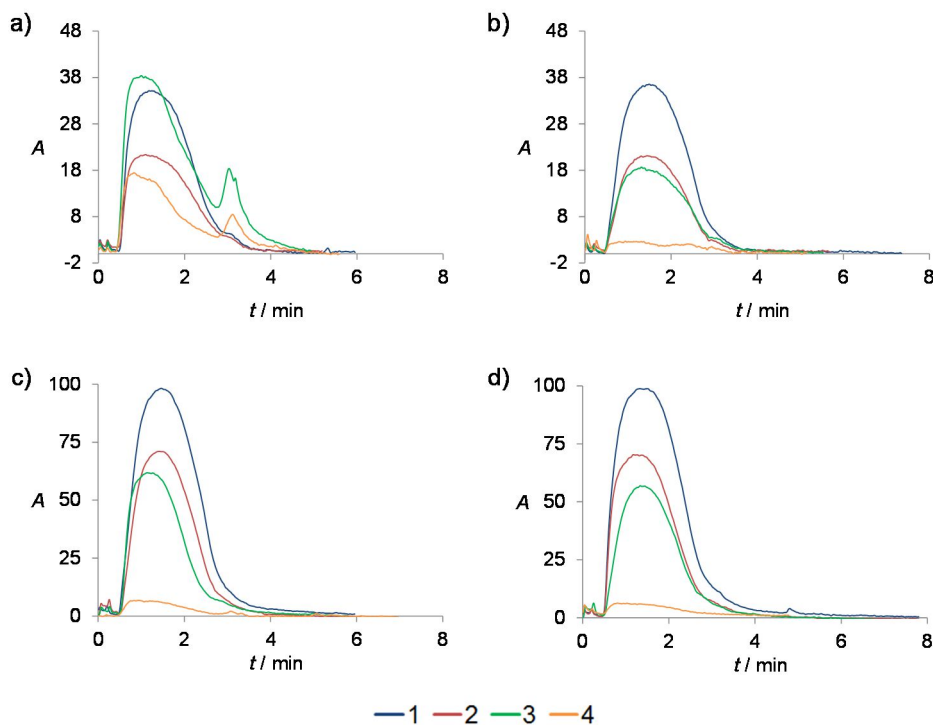


Figura 102. Cromatogramas para suelos (1) compost, (2) de monte, (3) de huerto y (4) urbano correspondientes a: muestras A, inyecciones: a) en ausencia y b) en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%); para muestras SB, inyecciones: c) en ausencia y d) en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%). Nota: diluciones 1:16 para la muestras, exposición de las muestras al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de 50 min.

8.7 Porcentaje de retención de las AgNPs

8.7.1 En suelos diferentes

Habiendo realizado el experimento utilizando $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en las muestras A y SB, el cálculo de la retención de AgNPs en cada suelo puede ser hecho. Estimando la variación en el área de pico, considerando que representa un 90% de la señal inicial y comparando a la respuesta obtenida por una dilución equivalente de AgNPs, la cantidad de NPs en el sobrenadante (muestras A) puede estimarse y por diferencia, las partículas adsorbidas en cada suelo. La **Tabla 46** muestra los resultados (junto con los obtenidos en el caso del microanálisis de SEM, comentado posteriormente): las AgNPs fueron retenidas en menor medida en el suelo de huerto (15.1%), moderadamente en el suelo urbano (47.6%) y cuantitativamente en suelos compost y de monte (> 99%). Entonces, se puede concluir que

en suelos con mayor cantidad de SOM, la retención de partículas fue más elevada. En consecuencia, la SOM es el factor más importante en la adsorción de NPs en suelo y a pesar de que, por ejemplo, los suelos compost y de monte tuvieran las partículas de suelo más pequeñas o más grandes en proporción (ver **Tabla 45**). No obstante, otros estudios se llevarán a cabo para estimar la influencia del tamaño de partícula de los suelos (i.e. la PSD) en la retención de AgNPs.

Tabla 46. Porcentaje de retención de AgNPs (AgNPs (%)) cuantificado por IT-SPME-Cap-LC-DAD en los diferentes suelos contaminados y porcentaje relativo de plata (Ag (%)) detectado por microanálisis de SEM.

Suelo	AgNPs (%)	Ag (%)
Compost	>99	0.69
Monte	>99	0.66
Huerto	15.1	0.35
Urbano	47.6	0.44

8.7.2 En fracciones de tamaño diferente para un determinado suelo

Para estudiar el efecto del tamaño de partícula del suelo en la adsorción de NPs, se seleccionó al suelo urbano ya que la retención AgNPs-suelo fue intermedia y después de tamizar, se obtenían 5 fracciones de tamaño diferente en una proporción similar (ver **Tabla 45**). En consecuencia, el suelo urbano fue tamizado y el mismo experimento realizado para las muestras A con Na₂S₂O₃ anteriormente fue repetido, pero esta vez en las 5 fracciones obtenidas (bajo 100 μm, 100-200 μm, 200-300 μm, 300-400 μm y sobre 400 μm o fracción gruesa). En vez de “muestras A”, se denominarán “muestras F”. Los resultados para estas muestras se pueden observar en la **Figura 103**. Como se puede apreciar, las señales fueron más altas para las fracciones con menor tamaño de partícula (**Figura 103 a**). Para partículas más grandes (sobre 200 μm), las áreas de pico fueron similares.

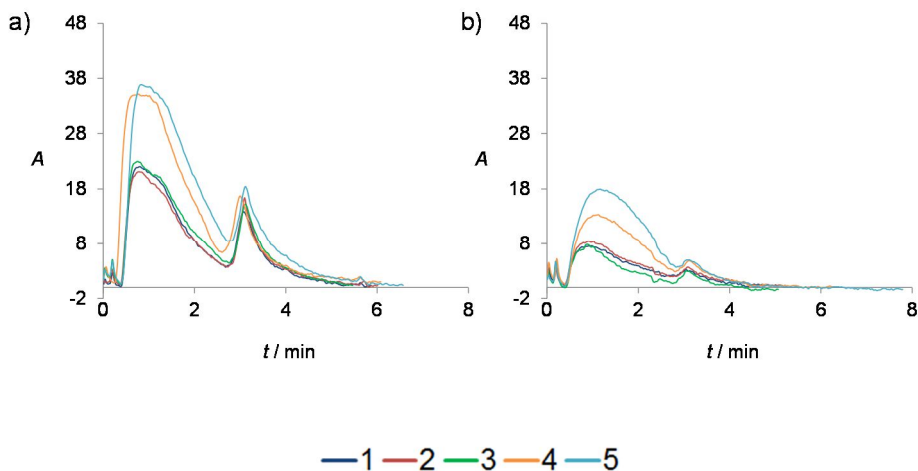


Figura 103. Cromatogramas obtenidos midiendo las muestras F en a) ausencia y b) presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%) para diferentes fracciones de suelo urbano: (1) fracción gruesa o sobre $400\ \mu\text{m}$, (2) $300\text{-}400\ \mu\text{m}$, (3) $200\text{-}300\ \mu\text{m}$, (4) $100\text{-}200\ \mu\text{m}$ y (5) bajo $100\ \mu\text{m}$. Nota: diluciones 1:16 para las muestras, exposición de las muestras al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de 50 min.

Tabla 47. Porcentaje de retención de las AgNPs (AgNPs (%)) en las distintas fracciones y total cuantificado por IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Fracción	Fracción (%)	AgNPs (%)
< $100\ \mu\text{m}$	18.67	38.9
$100\text{-}200\ \mu\text{m}$	21.59	40.8
$200\text{-}300\ \mu\text{m}$	19.58	52.9
$300\text{-}400\ \mu\text{m}$	11.59	54.7
> $400\ \mu\text{m}$	28.57	49.8
total	100	47.0

El porcentaje de retención de NPs se calculó como en la sección precedente. En la **Tabla 47** se presentan los resultados. Para las 3 fracciones de mayor tamaño, la retención de AgNPs fue comparable (el valor más alto para la fracción de $300\text{-}400\ \mu\text{m}$) y mayor a la

obtenida para las fracciones de menor tamaño. Si se calculase la retención total de AgNPs considerando los valores obtenidos para cada fracción y la proporción de dicha fracción en el suelo, se obtendría un 47 % (similar al 47.6% conseguido en la sección 8.7.1, con un error de estimación del 1.3%). Sin embargo, a pesar del hecho que las partículas más grandes del suelo retengan más eficientemente a las NPs probablemente debido a mayor superficie de contacto, el factor del tamaño de partícula del suelo es secundario comparado al causado por mayores cantidades de SOM.

8.8 Microanálisis de SEM

Habiendo trabajado con los sobrenadantes puestos en contacto con un suelo en particular, pero no con el suelo mismo, la etapa final consistió en estimar la cantidad de plata en los 4 suelos estudiados por microanálisis de SEM (procedimiento comentado en la sección 3.2.2.3 de la Metodología Experimental). Como las AgNPs en suelo pueden sufrir diferentes procesos [177], se decidió determinar la cantidad total de plata.

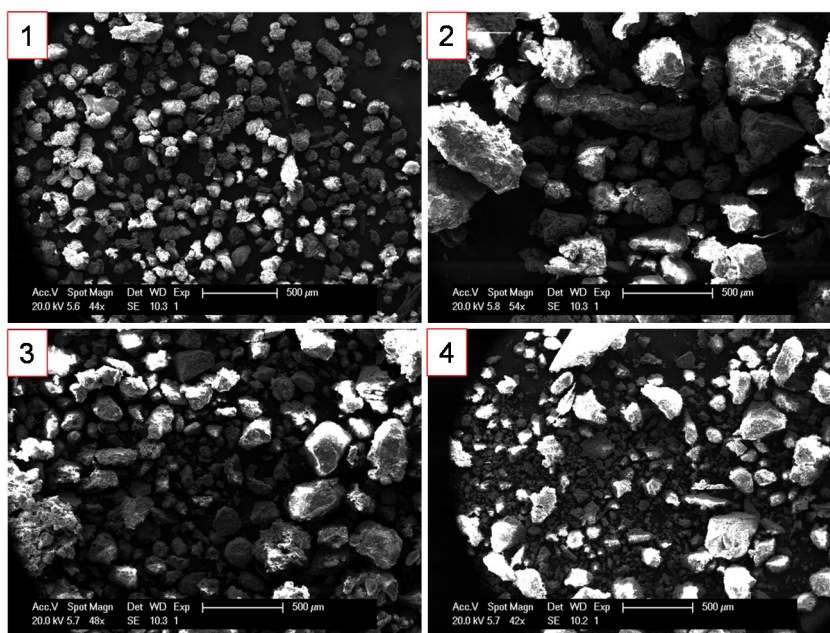


Figura 104. Imágenes obtenidas por SEM (escala de 500 μm) para los 4 suelos estudiados: (1) compost, (2) de monte, (3) de huerto y (4) urbano.

Tabla 48. Microanálisis de SEM (*K* y *L* representan radiaciones características). Composición elemental en los 4 suelos estudiados.

	Compost	Monte	Huerto	Urbano
Elemento	Masa (%)			
O K	67.83	50.64	57.82	59.13
Mg K	1.30	0.37	0.91	0.99
Al K	2.69	14.98	6.86	4.82
Si K	9.83	26.76	20.14	16.42
Ag L	0.69	0.66	0.35	0.44
K K	2.28	2.24	2.69	1.95
Ca K	12.72	1.84	7.28	13.25
Fe K	2.66	2.51	3.96	3.01

Los estudios con esta técnica fueron semi-cuantitativos y los resultados se presentan en la **Tabla 46**. Por su parte, las composiciones elementales estimadas por suelo se muestran en la **Tabla 48** (junto con imágenes SEM en la **Figura 104**). En la **Tabla 46**, se aprecia que las cantidades de plata para los 4 suelos en cuestión se correlacionan bien con los porcentajes de retención calculados para cada caso.

8.9 Conclusiones

En el presente trabajo, se realizaron estimaciones de la adsorción de AgNPs en diferentes suelos midiendo el cambio en la SPRB. Los estudios se llevaron a cabo mezclando una cantidad de suelo con dispersiones de NPs y después del correspondiente procedimiento involucrando la adición de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, un reactivo que selectivamente destruye las AgNPs entre el resto de componentes extraídos de la matriz (que absorben, presumiblemente HAs), la cuantificación de la retención por IT-SPME-Cap-LC-DAD fue posible.

A través de la pérdida de señal a 400 nm (el máximo de la SPRB), los porcentajes de adsorción de NPs fueron calculados en suelos distintos: compost (> 99%), de monte (> 99%), de huerto (~ 15%) y urbano (~ 47%). Para este último y después de tamizar, los porcentajes de retención de AgNPs se calcularon en las distintas fracciones obtenidas, siendo superiores para las fracciones con mayor tamaño de partícula de suelo. Por lo tanto,

la adsorción de las NPs en un suelo está afectada, principalmente, por la cantidad de SOM y, secundariamente, por propiedades como el tamaño de partícula del suelo. El microanálisis de SEM realizado respalda los resultados obtenidos.

En resumen y teniendo en cuenta que cada suelo retiene de manera particular a las AgNPs, que pertenecen a los ECs, la metodología propuesta hace posible caracterizar y cuantificar la interacción AgNPs-suelo a través de la variación de una propiedad característica (y que en este sistema responde a la concentración) de las NPs. Esto constituye un paso adelante en materia de comprensión del comportamiento de estos ECs en matrices medioambientales tan complejas como los suelos.

Capítulo 9.

PAHs en sedimentos (Parte 1)

9.1 MSPD como técnica de extracción innovadora. Interés de su optimización.

En esta Tesis y como se ha mencionado en secciones previas, se ha estudiado los PAHs (15 de los 16 regularizados por la USEPA), en sedimentos (la legislación imperante es relativa a aguas, lo que hace que sea de interés analizar estos compuestos en otros compartimentos ambientales). Sin embargo, esto no impide que los métodos desarrollados puedan ser aplicados a otros PAHs (que pueden existir en más de 100 combinaciones [212]) o sus derivados (estudiados posteriormente), sobre los que la normativa es más escasa. Se ha trabajado con dos metodologías que difieren fundamentalmente en la técnica de extracción utilizada. La primera de ellas (la cual es el objeto de este capítulo) está basada en la MSPD acoplada a IT-SPME-HPLC-FLD y se ha adaptado al estudio de sedimentos, luego de ser implementada con éxito en la determinación de PAHs en biota [73].

La MSPD fue discutida a grandes rasgos en la sección 1.5.5.1 de la Introducción. Comparada a otras técnicas de extracción más clásicas (e.g. Soxhlet), la MSPD reduce el consumo tanto de muestras como de disolventes, además de no requerir instrumentación especial y ser adecuada para la miniaturización [298]. En el presente, esta técnica se ha acoplado con éxito a otros procedimientos de extracción más modernos como la IT-SPME [73] o la extracción líquido-líquido homogénea [299]. Su versatilidad se ve plasmada en las diversas aplicaciones que hacen uso de ella en el campo toxicológico y medio ambiental [232,300,301].

No obstante y a menudo, la pureza de los extractos finales obtenidos por la MSPD debe ser mejorada utilizando procedimientos adicionales de limpieza de muestra (SPE o capas extra de adsorbente en la misma MSPD). Por otra parte, debido a que la selectividad y eficiencia del procedimiento depende principalmente del adsorbente abrasivo y del disolvente de extracción, la optimización requiere el empleo de diferentes combinaciones de adsorbente/disolvente. Dicho adsorbente suele ser una fase extractiva empleada en SPE (C_{18} y C_8 como fases reversas, así como gel de sílice y alúmina como fases normales), aunque materiales alternativos (e.g. grafeno y MIPs) han sido reportados [302,303]. En resumidas cuentas, la MSPD es un procedimiento que puede ser optimizado (y así, mejorado) en diferentes aspectos.

En la vasta mayoría de métodos en la literatura, la selección de la fase extractiva se realiza de acuerdo a las señales de fondo de los cromatogramas cuando se procesan muestras (con “fondo” se hace referencia a la señal que no es proporcionada por los analitos de un patrón de PAHs en este caso). Los picos en el fondo generalmente se atribuyen a componentes de la matriz, por lo que las posibles interferencias que vienen del propio material adsorbente (i.e. impurezas) no han recibido la atención apropiada [304]. No obstante, las impurezas del adsorbente pueden impactar negativamente en los resultados, particularmente en el análisis traza de contaminantes. Un ejemplo emblemático es la

determinación de PAHs (sección 1.5.5 de la Introducción), extendidos en el medio ambiente y cuya monitorización en las diferentes matrices es de suma necesidad.

Como se ha discutido, estos compuestos se adsorben con facilidad en suelos, sedimentos y biota (valores altos de $\log K_{oc}$ y $\log K_{ow}$), siendo su análisis intensivo en dichas matrices ambientales y en otras muestras (e.g. comida y lodos de depuradora) [73,220,304-307]. En general, las fases extractivas se mezclan y trituran directamente con las muestras, aunque algunos procedimientos incorporan lavados previos del adsorbente para eliminar posibles interferencias. No obstante, un estudio del efecto de la presencia de impurezas en la fase extractiva utilizada en la determinación de PAHs no ha sido hecho de manera sistemática, siendo el tópico central del presente trabajo (todo esto con el objeto de optimizar y mejorar la MSPD). Como resultado del mismo, se propone un protocolo de lavado mediante el uso de disolventes orgánicos y el empleo de ultrasonidos en las fases C_{18} y otras típicamente empleadas en la MSPD (e.g. gel de sílice y florisil) para disminuir efectivamente las interferencias.

9.2 MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD

La MSPD, el sistema HPLC-FLD empleado y su acoplamiento resultante con la IT-SPME (i.e. IT-SPME-HPLC-FLD) para la determinación de PAHs en sedimentos se describen en las secciones 3.3.1.2, 3.2.31 y 3.3.2.1 (**Figura 34**) de la Metodología Experimental respectivamente. Por su parte, las condiciones experimentales se muestran en la sección 3.5 del mismo capítulo. Ciertos aspectos no han sido discutido aún: el empleo del agua en la IT-SPME, las condiciones de gradiente de la bomba de HPLC y las del detector FLD. Más información se puede consultar en el Anexo 1.

Al finalizar la MSPD, los extractos (volumen de 0.8 mL aproximadamente) se diluyen con agua (2.6 mL), previo a su inyección al sistema IT-SPME-HPLC-FLD. Esto se realiza para incrementar la polaridad de los extractos finales y favorecer la retención de los analitos en el capilar de IT-SPME (favoreciendo la preconcentración). Además, después de inyectar la muestra (3 mL), se lava con agua (100 μ L) para eliminar las impurezas más polares indeseadas.

En cuanto a las condiciones del gradiente, se variaron tanto la composición como el flujo de la fase móvil. La composición inicial de ésta fue de agua-MeOH-MeCN en una proporción 20:55:25 (v/v/v). Esta composición se mantuvo constante hasta el min 8 y luego, el contenido de MeCN se incrementó para alcanzar el 100% al min 16. MeCN al 100% fue la fase móvil hasta el término del análisis. Por su parte, el flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min en el intervalo de 0-8 min, luego fue subido linealmente a 1.5 mL/min hasta el min 16. A continuación, el flujo se dejó constante hasta el final (min 24). Al término del análisis, tanto para el flujo como para la composición de la fase móvil, se regresó a las condiciones

de partida en 2 min (condiciones que se mantuvieron por 3 min, antes de inyectar la siguiente muestra).

En lo que respecta al detector, éste fue programado para medir intensidad de fluorescencia (que se designará como “I” en el capítulo en cuestión y en el siguiente) a longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) de 265 nm y de emisión (λ_{em}) de 335, 375, 425 y 475 nm con un valor de ganancia de 17 (que se cambiaba a 18 para algunos PAHs). En la **Tabla 49** se presentan las condiciones de detección para cada uno de los PAHs analizados, así como los tiempos de retención (t_r) obtenidos bajo las condiciones cromatográficas empleadas.

Tabla 49. Condiciones de detección y tiempos de retención para los PAHs estudiados.

Compuesto	t_r (min)	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)			
		265/335	265/375	265/425	265/475
Naf	5.6	X			
Acn	8.4	X			
Fl	9.1	X			
Fen	10.4		X		
Ant	12.0		X	X	
Flr	13.1			X	X
Pir	13.9		X	X ^a	
BaA	15.8		X ^a	X	
Cri	16.3		X	X ^a	
BbF	17.7			X	X
BkF	18.4			X	X ^a
BaP	19.3			X	X ^a
DahA	20.7			X	
BghiP	21.9			X	X ^a
IncdP	22.8				X

^aCondiciones de detección alternativas

9.3 Tratamiento de la fase adsorbente

Dos estrategias diferentes fueron evaluadas para eliminar las impurezas que pudiesen interferir en la determinación de PAHs: primero, lavado previo; segundo, UAE seguido de lavado del adsorbente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y a temperatura ambiente.

El lavado previo se llevó a cabo introduciendo 400 mg de adsorbente en un cartucho de SPE. Luego, una alícuota de disolvente de lavado se hizo pasar por el cartucho aplicando vacío. Después la fase extractiva se pasó a un mortero para continuar la MSPD (sección 3.3.1.2 de la Metodología Experimental).

En los ensayos que involucraban UAE, el adsorbente se transfirió a un cartucho de SPE y a continuación, éste fue lavado con 1 mL (si no se dice lo contrario) de disolvente. Una vez que el disolvente alcanzó la salida del cartucho, este se cerró con una tapa de PVC y el cartucho fue introducido en un baño de ultrasonidos hasta que el nivel de agua del baño estuviese por encima del nivel del disolvente de extracción en el cartucho. Luego se sonicó durante un tiempo definido. Después de la sonicación, la tapa de PVC se quitó y se hizo pasar el disolvente por vacío y a continuación, se lavó con el mismo disolvente o uno diferente. Finalmente, se secó con aire. Finalizado esto, la fase extractiva se transfirió a un mortero para proseguir con la MSPD. Diferentes disolventes y tiempos de sonicación fueron ensayados.

9.4 MSPD con adsorbente sin tratar

La posibilidad de analizar PAHs utilizando la MSPD con un adsorbente (en este caso, C₁₈) sin tratar para procesar las muestras fue evaluada. Para esto, se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.3.1.2 de la Metodología Experimental, pero y como se indica en ella, sin añadir el sedimento (i.e. procesar los 400 mg de C₁₈). Por último, 3.0 mL del extracto final (después de la dilución con agua) se inyectaron en el sistema IT-SPME-HPLC-FLD (modo de inyección descrito en la sección 3.3.2.1 de la Metodología Experimental, ver **Figura 33**).

En la **Figura 105** se muestran los cromatogramas obtenidos a los 4 pares de longitudes de onda de trabajo ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Estos cromatogramas revelaron la presencia de numerosos compuestos en los extractos finales. La mayoría de ellos eluyó entre 5-18 min, los cuales exhibieron respuestas elevadas a 265/335 nm y 265/375 nm; mientras que para los otros dos pares de longitudes de onda, se observaron cromatogramas del fondo bastante limpios (señales b, **Figura 105**).

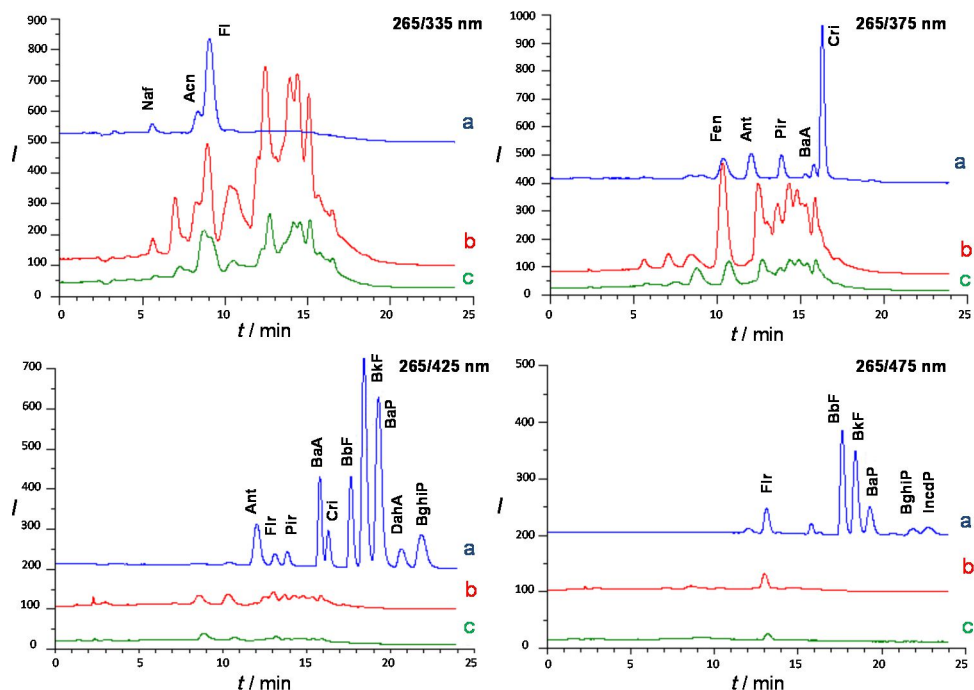


Figura 105. Cromatogramas obtenidos a los pares de longitudes de onda de trabajo para: (a) un patrón de PAHs de concentración 0.58 ng/mL; y los extractos finales recogidos después de triturar 400 mg de (b) C_{18} sin tratar, y (c) C_{18} lavada previamente con 1 mL de MeCN.

La **Figura 105** (señales a) también presenta el cromatograma obtenido para una disolución preparada fortificando una mezcla de MeCN (0.8 mL) y agua (2.6 mL) con 20 μ L de patrón de PAHs (100 ng/mL de cada compuesto). Por lo tanto, este patrón preparado tenía una concentración de 0.58 ng/mL. Cabe indicar que, asumiendo una recuperación cuantitativa de los analitos en la MSPD, este valor de concentración correspondería a una concentración para cada PAHs de 20 ng/g en una hipotética muestra sólida de 100 mg. Para sedimentos, concentraciones de PAHs a niveles bajos de ng/g pueden esperarse [308].

Una alta concordancia se observó entre los tiempos de retención de algunos PAHs (señales a) y algunos de los picos de los cromatogramas obtenidos cuando se procesó el adsorbente (señales b). Este es el caso del Naf, Acn, Fl, Flr y Fen. También, se correspondieron las razones de las alturas de pico medidas a dos pares diferentes de longitudes de onda (señales b), y las razones observadas para los PAHs que eluían a estos mismos tiempos de retención (señales a). Por ejemplo, la razón de altura de pico medida a

265/475 nm y 265/425 nm en el extracto del adsorbente al t_r del Flr (13.1 min) fue 1.54 ± 0.07 , mientras que la medida para este compuesto en el patrón fue 1.55 ± 0.05 ($n=3$). Este resultado sugiere que los picos observados en los cromatogramas del fondo (i.e. los del extracto que proviene del adsorbente) deben corresponder a los mismos PAHs mencionados, lo que concuerda con resultados reportados en la bibliografía [220].

En algunos casos, la intensidad de pico en los cromatogramas relativos al adsorbente es mucho más elevada que la del patrón. Ilustrando este hecho y en las condiciones óptimas para detectar al Fen (265/375 nm), la altura de pico del supuesto Fen en el cromatograma obtenido para el adsorbente es 5 veces mayor que la conseguida en el patrón. En otras palabras, el uso directo de la fase C_{18} introduciría un error por exceso de este PAHs si estuviera presente en las muestras a niveles de ng/g.

Por otra lado, existen picos interferentes a t_r similares a los de otros PAHs como en el caso del Ant ($t_r = 12.0$ min) a 265/375 nm. Sin embargo, a este mismo tiempo no se observó pico a 265/425 nm en el extracto del adsorbente lo que indica que el pico a 265/375 nm no correspondía al Ant. Este PAHs se puede cuantificar a 265/425 nm prácticamente libre de interferencia. Así, las interferencias pueden ser minimizadas trabajando a condiciones de detección diferentes de la óptima. Por ejemplo, la condición óptima para detectar al Pir es 265/375 nm, pero una interferencia debido a los picos del fondo eluyó a su t_r (13.9 min). Dicha interferencia es mucho menor a 265/425 nm, aunque la señal del analito también lo es. También, puede ocurrir el caso contrario: para el BaA existe una interferencia a su t_r (15.8 min) a 265/375 nm; no obstante, a su condición de detección óptima (265/425 nm) la interferencia no es importante.

En resumen, los resultados obtenidos indican que no se pueden utilizar fases C_{18} sin tratamiento previo si se busca determinar PAHs a niveles bajos de ng/g, debido a la interferencia directa causada por la presencia de trazas de algunos PAHs y otras impurezas en el adsorbente. Para algunos de los PAHs estudiados, las interferencias causadas por otras impurezas pueden ser eliminadas o reducidas, pero a menudo a costa de sensibilidad. Como se afirmó anteriormente, ciertos procedimientos de MSPD incorporan etapas adicionales para eliminar interferencias que se extraen en el proceso. Sin embargo, en la presente aplicación hubo casos en que analito e interferente co-eluido resultaron ser la misma sustancia por lo que el tratamiento después de realizar la MSPD no es viable; en cambio, dicho tratamiento puede ser realizado en el adsorbente previo a su mezcla con la muestra.

9.5 Lavado previo del adsorbente

Un lavado previo de los adsorbentes con un disolvente orgánico o mezcla de disolventes es el tratamiento más común en la MSPD y se han empleado disolventes como MeCN, hexano, acetona, entre otros.

En el presente estudio, se ensayaron diferentes disolventes para eliminar las impurezas del adsorbente antes de la etapa de trituración. Para lograr este objetivo, 400 mg de adsorbente se introdujeron en un cartucho de SPE y volúmenes variables (0.5-3.0 mL) de MeCN, acetona, THF, MeOH y n-hexano se pasaron por los cartuchos. Después de secar con aire, 1.2 mL de MeCN se hizo pasar por los cartuchos, y los extractos recolectados se procesaron como se describió anteriormente (no hubo trituración). Los cromatogramas obtenidos fueron relativamente limpios y la mayoría de los picos que se encontraron para adsorbentes sin tratar (ver **Figura 105**) no se detectaron.

En otros experimentos, el adsorbente se puso en un mortero después de la etapa de lavado y luego se trituró por 5 min. Después de dicha trituración, el adsorbente fue transferido a un cartucho de SPE, se hizo pasar 1.2 mL de MeCN y los extractos se procesaron de la manera usual. Esta operación se realizó para cada uno de los adsorbentes lavados con los diferentes disolventes orgánicos. A diferencia de los extractos obtenidos sin haber triturado la fase, se observaron muchos picos en los cromatogramas. Para todos los disolventes ensayados, los perfiles cromatográficos fueron similares y muchos de los picos observados para la fase extractiva sin tratar fueron detectados incluidos los de los supuestos PAHs, aunque su intensidad bajó considerablemente. Como ejemplo, en la **Figura 105** (señales c) se representan los cromatogramas obtenidos para el lavado de disolvente con 1 mL de MeCN (emplear mayor cantidad de disolvente resultó en una mejoría poco significativa).

Por otra parte, los picos más intensos se observaron en todos los disolventes ensayados y lavados secuenciales con diferentes disolventes no mejoraron de manera importante los resultados.

La comparación de los cromatogramas obtenidos con y sin trituración sugirió que el lavado previo elimina las impurezas de la superficie del adsorbente, pero que el hecho de triturar rompería partículas sólidas liberando cantidades adicionales de contaminantes [309]. De acuerdo con la bibliografía, el lavado previo puede permitir la cuantificación adecuada de PAHs a niveles de $\mu\text{g/g}$ [73,220,307] pero este tratamiento no es suficiente si se busca analizar muestras que contienen concentraciones menores de los analitos.

9.6 Lavado con ultrasonidos (UAE)

Para facilitar la eliminación de impurezas de la fase extractiva, se emplearon ultrasonidos en el lavado. La MSPD combinada a sonicación se ha introducido recientemente como una alternativa para incrementar la eficiencia de extracción de diferentes analitos y matrices [310-312]. Sin embargo, hasta el momento los ultrasonidos no han sido empleados para purificar los adsorbentes de la MSPD.

En este estudio, porciones de adsorbente (400 mg) fueron introducidos en cartuchos MSPD y éstos fueron lavados con volúmenes variables de un disolvente orgánico y puestos en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Después de sonicar por un tiempo definido, se eliminó el disolvente de extracción aplicando vacío y se lavó la fase extractiva con el mismo disolvente. Este paso se puede repetir con un disolvente diferente. Dicha fase fue secada con aire, transferida a un mortero y luego triturada por 5 min. A continuación, el adsorbente se introdujo en un cartucho de SPE y una alícuota de 1.2 mL de MeCN se hizo pasar por este cartucho. Para los diferentes disolventes ensayados, los extractos recogidos se procesaron de la manera usual.

Los cromatogramas resultantes revelaron que la combinación UAE y lavado es mucho más efectiva para eliminar las impurezas de la fase extractiva. Este hecho se ilustra en la **Figura 106** que presenta los cromatogramas obtenidos con los disolventes ensayados a los dos pares de longitudes de onda más problemáticos (265/335 nm y 265/375 nm). Acetona, THF y MeOH proporcionaron resultados similares, aunque utilizando THF el área de pico del compuesto eluyendo al t_r del Flr (13.1 min) a 265/475 nm (no mostrado en la **Figura 106**, ver **Figura 105**) fue reducido sustancialmente. El THF fue considerado el mejor disolvente para eliminar impurezas del adsorbente, aunque se obtuviera un pico adicional a los 11.8 min (señal e, **Figura 106**), el cual puede ser atribuido a la presencia de un aditivo en el disolvente que interfiere con la determinación del Ant.

Parámetros como el volumen de disolvente orgánico utilizado en la etapa de lavado y el tiempo de sonicación fueron optimizados. En la **Tabla 50** se muestran las áreas de pico medidas en los cromatogramas del fondo (i.e. señal del fondo de los extractos analizados) a los t_r de algunos PAHs (a su respectiva $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, ver **Tabla 49**) empleando acetona como disolvente extractivo. De acuerdo con estos datos, un volumen de 1.0 mL de acetona es suficiente para quitar la mayoría de impurezas liberadas desde la fase extractiva por los ultrasonidos.

En cuanto al tiempo de sonicación, se encontró que la intensidad de las señales del fondo disminuían entre 1-10 min como se muestra en la **Figura 107**. Extender dicho tiempo no mejoró los cromatogramas significativamente. La misma tendencia se observó para otros disolventes ensayados.

Una mejoría adicional de los cromatogramas del fondo se obtuvo incorporando una etapa de UAE extra. Diferentes combinaciones de disolventes fueron estudiadas y el mejor resultado se consiguió empleando THF en la primera etapa de extracción, seguido de una extracción con acetona. Como se afirmó antes, el THF proporcionó los extractos más limpios, mientras que la acetona en la segunda extracción redujo la señal del fondo y permitió eliminar el pico correspondiente al aditivo del THF.

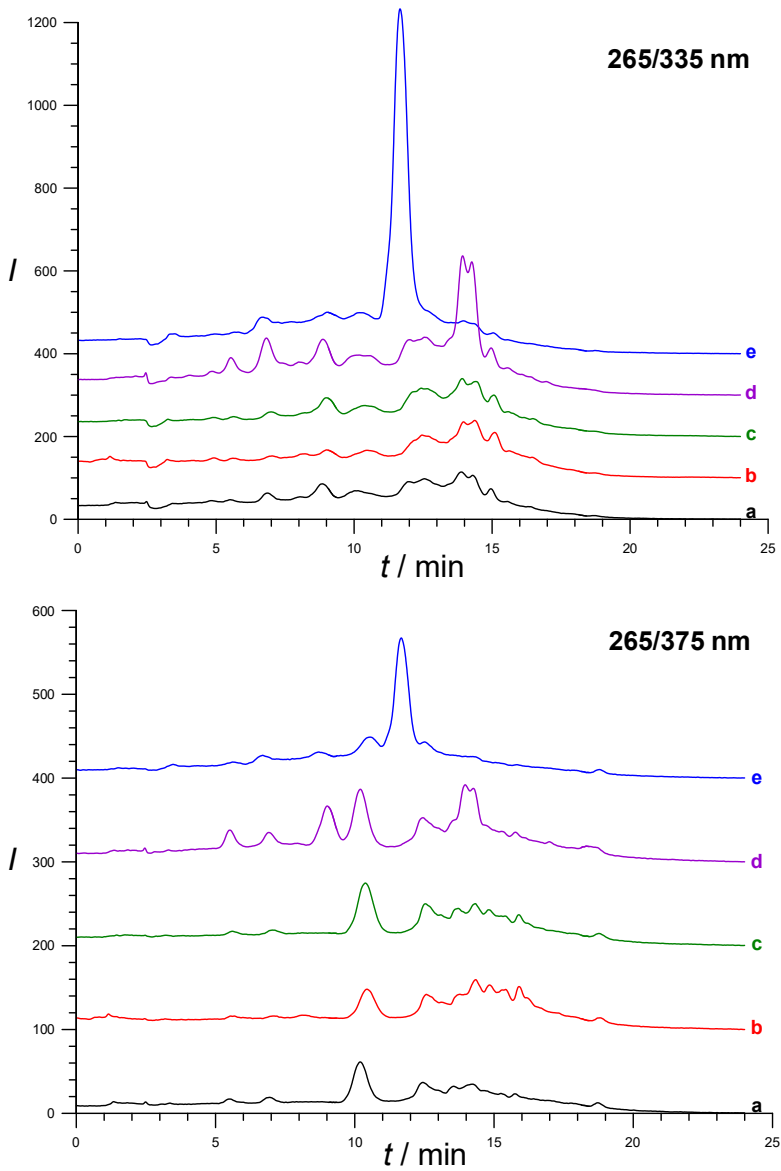


Figura 106. Cromatogramas a 265/335 nm y 265/375 nm de los extractos recogidos después de triturar 400 mg de fase C_{18} luego de sonicación con: (a) acetona, (b) MeOH, (c) MeCN, (d) *n*-hexano y (e) THF.

Tabla 50. Efecto del volumen de disolvente en los cromatogramas del fondo obtenidos de la fase C_{18} lavada con acetona por UAE. Las señales medidas a los t_r y $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ óptimos para algunos de los PAHs estudiados.

Analito	Señal del fondo		
	0.5 mL	1 mL	2 mL
Naf	70	47	46
Fl	119.1	61.4	62.5
Fen	51.7	20.9	25.2
Ant	52.4	18.4	22.2
Pir	40.3	25.7	29.4
BaA	21.7	19.3	20.2

Por lo tanto el procedimiento final propuesto para lavar adsorbente se puede resumir de la manera siguiente:

- (1) Lavar el adsorbente en el cartucho con 1 mL de THF y taponarlo, introducir este cartucho en el baño de ultrasonidos por 10 min, luego eliminar el THF y hacer pasar 1 mL de acetona.
- (2) Lavar el adsorbente en el cartucho con 1 mL de acetona y taponarlo, introducir este cartucho en el baño de ultrasonidos por 10 min, luego eliminar la acetona y hacer pasar 1 mL de acetona.
- (3) Transferir el adsorbente al mortero para la MSPD, luego de secar con aire.

Ejemplos de los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones propuestas se pueden ver en la **Figura 108**. Adicionalmente, dichas condiciones se aplicaron a diferentes lotes de C_{18} , siendo los resultados muy similares a los que se presentan en la **Figura 108**.

Comparando las **Figuras 105** y **108**, se puede deducir que mediante el procedimiento propuesto las impurezas del adsorbente fueron efectivamente eliminadas, y todos los PAHs pueden ser cuantificados a sus respectivas condiciones óptimas de detección y libres de interferencias.

Cabe destacar que en la MSPD que hace uso de ultrasonidos (no como en la presente metodología en donde la UAE se emplea antes de la MSPD) no sólo se incrementan las recuperaciones de los analitos, sino también la cantidad de impurezas en los extractos recolectados. Esto puede ser la explicación de los valores inaceptablemente elevados de recuperación reportados en procedimientos MSPD asistidos por ultrasonidos [302,309], que generalmente se atribuyen a componentes de la matriz.

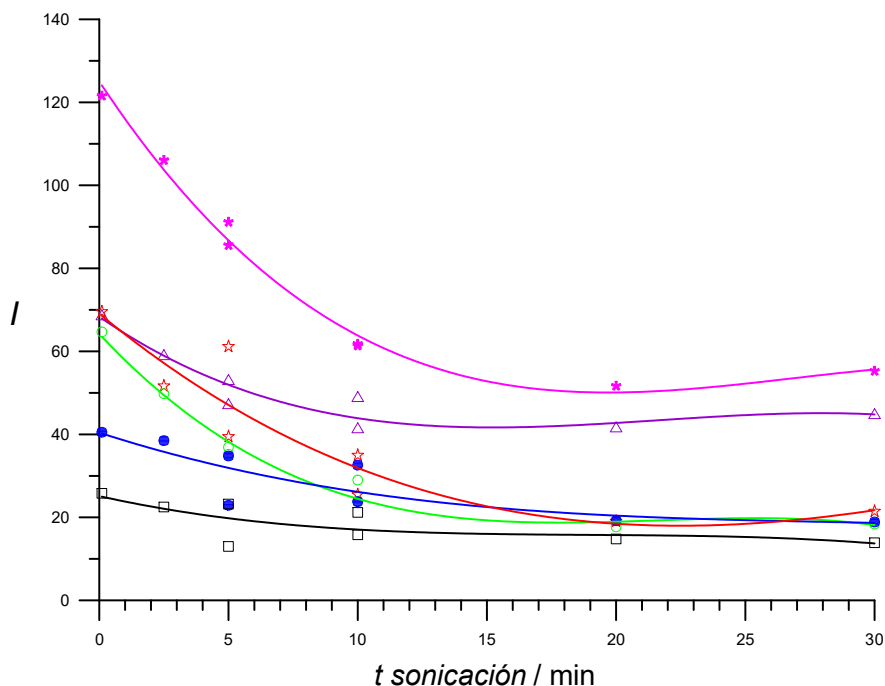


Figura 107. Efecto del tiempo de sonicación en los cromatogramas del fondo obtenidos de lavar la fase C_{18} con acetona por UAE. Las señales medidas a los t_r y $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ óptimos para algunos de los PAHs estudiados: (Δ) Naf, (*) Fl, (*) Fen, (\circ) Ant, (\bullet) Pir, (\square) BaA.

9.7 Utilidad del procedimiento propuesto

9.7.1 Aplicación a otras fases adsorbentes

La metodología de limpieza propuesta fue aplicada a otros adsorbentes típicamente usados en la MSPD como el gel de sílice y florisil. Estas fases han sido empleadas en la determinación de PAHs con esta técnica de extracción [220,304,306]. Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el uso directo de los adsorbentes sin tratar.

Los cromatogramas de los extractos recogidos de las fases sin tratar tuvieron varios picos, muchos de los cuales interferían con los analitos. Al igual que los cromatogramas conseguidos para la fase C_{18} sin tratar, la coincidencia en t_r y señales fluorescentes a los diferentes pares de longitudes de onda confirmaron la presencia de algunos PAHs (e.g. Naf y Fl) en fases extractivas. Además, los cromatogramas fueron diferentes a los correspondientes a la fase C_{18} , sugiriendo la presencia de otro tipo de contaminantes.

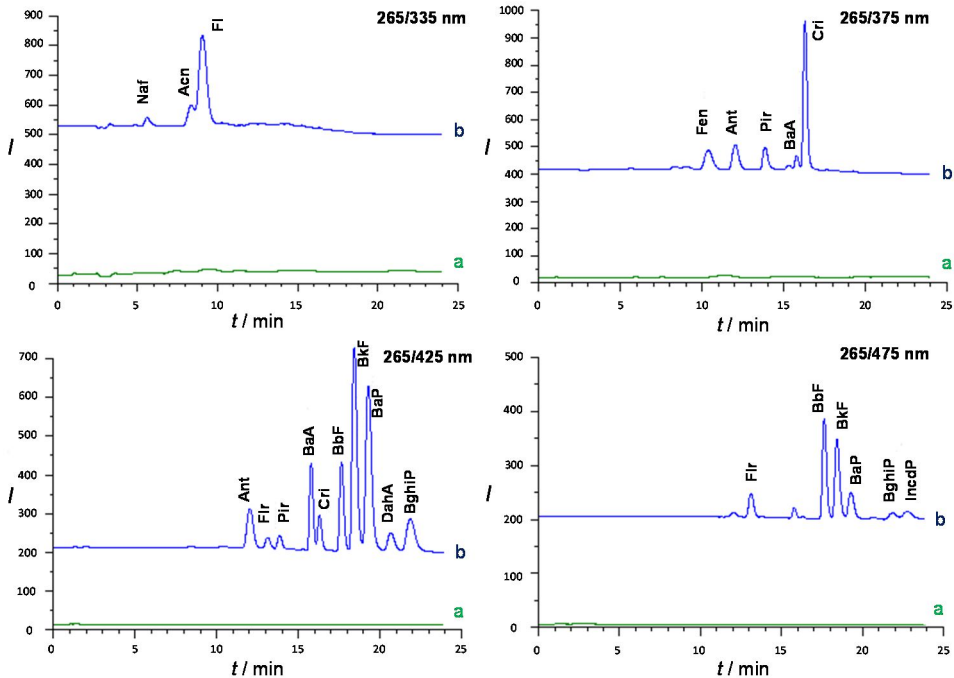


Figura 108. Cromatogramas obtenidos a las $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de trabajo para: a) extractos recolectados después de lavar el adsorbente con el procedimiento propuesto, y b) un patrón de PAHs de 0.58 ng/mL para cada compuesto.

Cuando se aplicó el procedimiento de lavado desarrollado a las otras fases, la intensidad de los picos interferentes fue reducida drásticamente (como para el C_{18}). Como ejemplo, la **Figura 109** presenta los cromatogramas obtenidos (a dos pares de longitudes de onda) antes y después de la aplicación de la metodología. Resultados similares se consiguieron para las otras longitudes de onda de trabajo. Por lo tanto, se concluye que el procedimiento elaborado es efectivo no sólo para C_{18} sino también para otra clase de adsorbentes comúnmente utilizados en la MSPD.

9.7.2 Aplicación a muestras reales

Se seleccionaron sedimentos marinos como muestras reales representativas para la aplicación del procedimiento desarrollado. Considerando que los sedimentos marinos secos son más abrasivos que otras muestras sólidas como comida o biota, se puede esperar una contaminación más elevada de las muestras en la etapa de trituración.

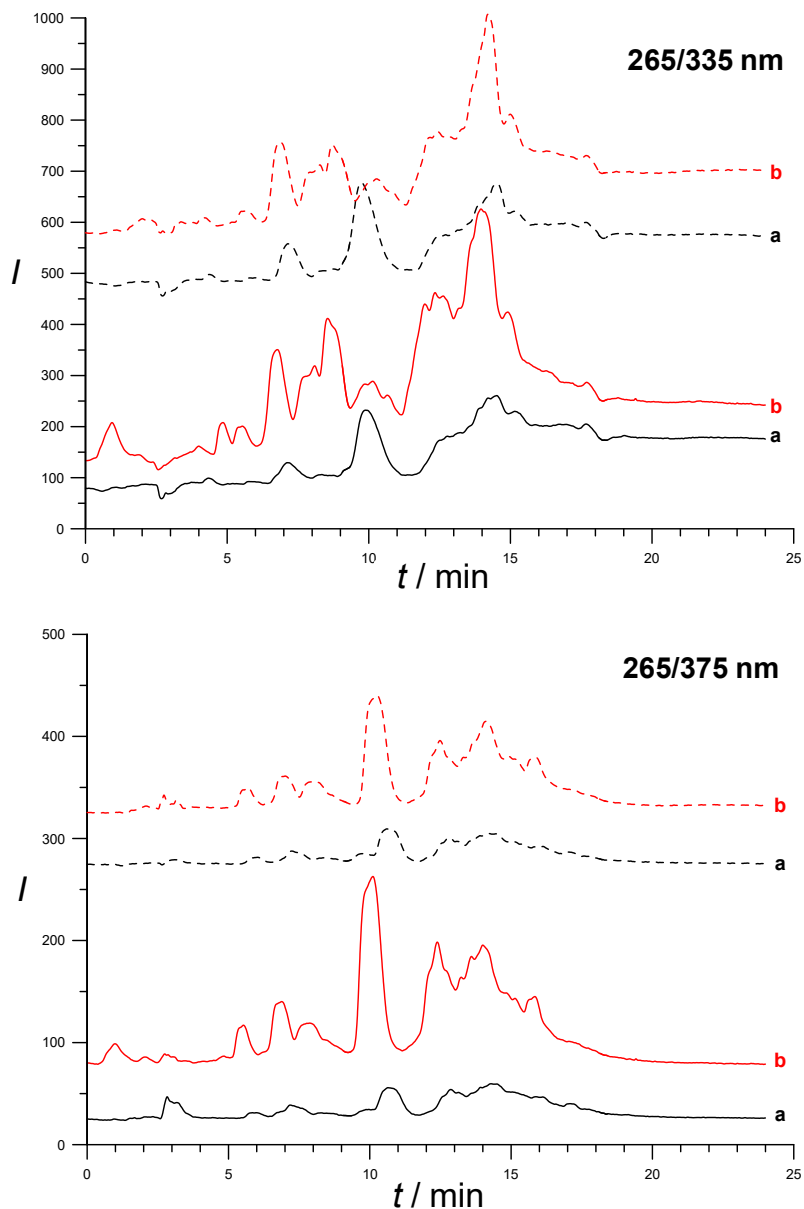


Figura 109. Cromatogramas a 265/335 nm y 265/375 nm de los extractos obtenidos luego de triturar gel de sílice (línea continua) y florisil (línea discontinua): (a) después de utilizar el procedimiento de lavado propuesto y (b) sin tratar los adsorbentes.

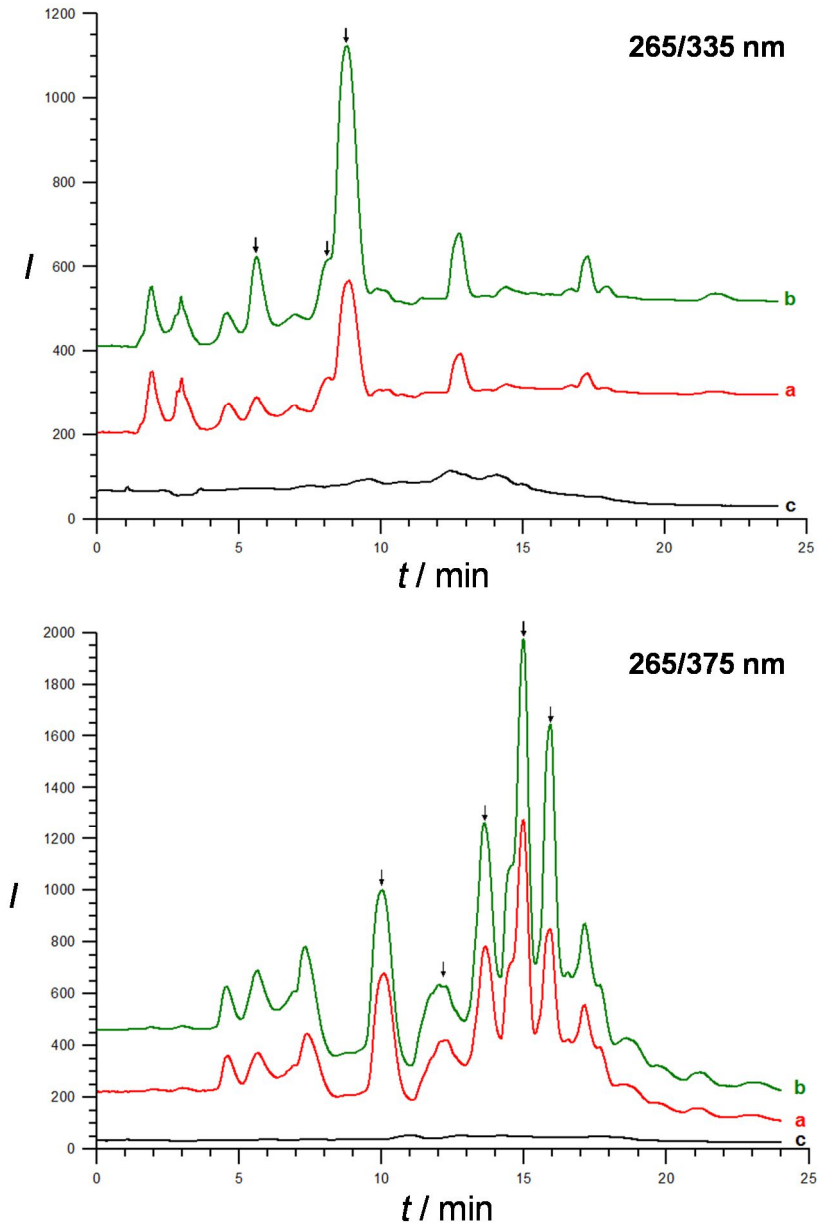


Figura 110. Cromatogramas obtenidos a 265/335 nm y 265/375 nm para: (a) muestra real (100 mg de sedimento marino) y (b) la misma muestra fortificada con 20 ng/g de PAHs (para cada compuesto), ambos obtenidos con fase C_{18} tratada con el procedimiento propuesto; la figura también muestra los cromatogramas obtenidos bajo las mismas condiciones sin muestra (c). Los picos correspondientes a los PAHs se marcaron con una flecha.

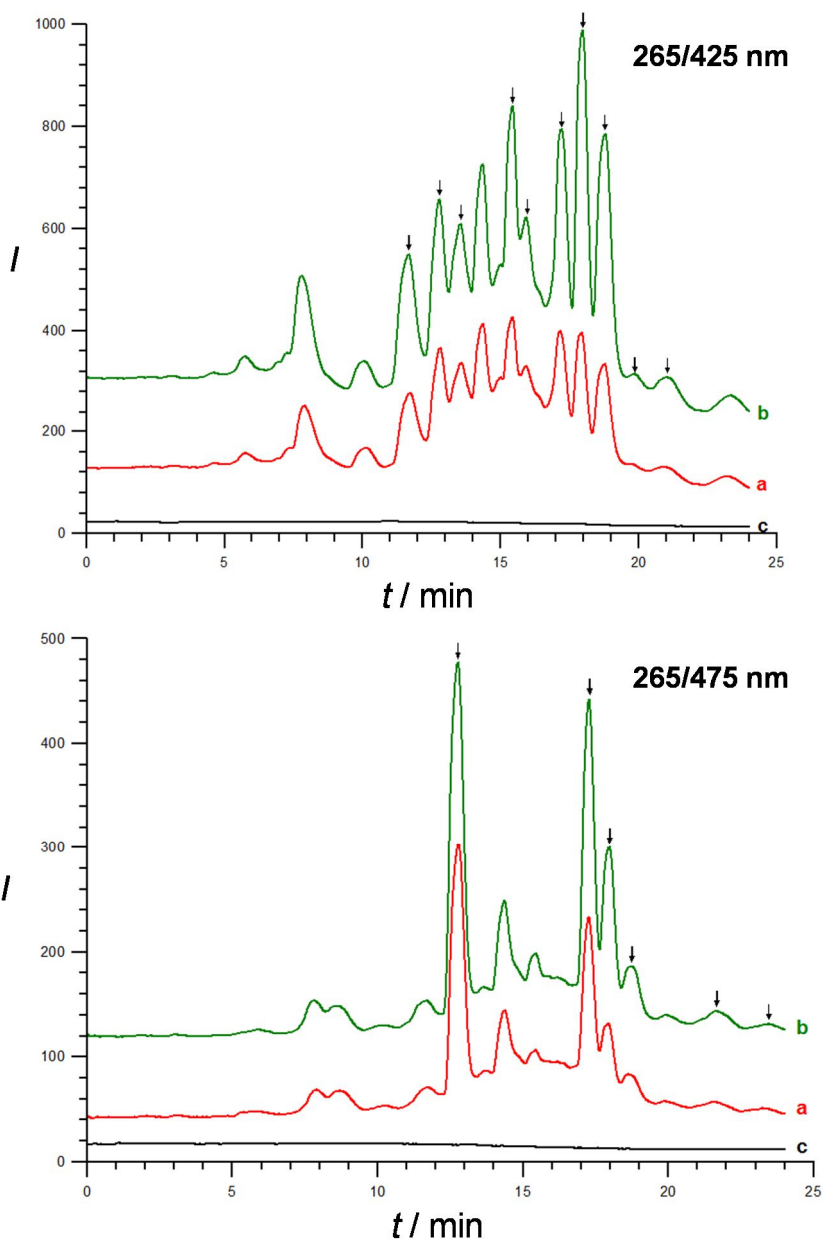


Figura 111. Cromatogramas obtenidos a 265/425 nm y 265/475 nm para: (a) muestra real (100 mg de sedimento marino) y (b) la misma muestra fortificada con 20 ng/g de PAHs (para cada compuesto), ambos obtenidos con fase C_{18} tratada con el procedimiento propuesto; la figura también muestra los cromatogramas obtenidos bajo las mismas condiciones sin muestra (c). Los picos correspondientes a los PAHs se marcaron con una flecha.

Porciones de C₁₈ lavadas siguiendo la metodología propuesta se utilizaron. Las **Figuras 110 y 111** muestran los cromatogramas de una de las muestras analizadas que contiene los PAHs estudiados a concentraciones de ng/g. En esta figura, también se presentan cromatogramas obtenidos para la misma muestra fortificando con 20 ng/g de cada uno de los PAHs en cuestión (ver **Figuras 110 y 111**, señales b). Los cromatogramas del fondo, i.e. obtenidos en ausencia de la muestra, confirmaron que los picos detectados no se debieron a impurezas en la fase extractiva (señales c de la **Figuras 110 y 111**).

La metodología de limpieza desarrollada permitió el procesamiento directo de extractos obtenidos de la MSPD por IT-SPME y HPLC-FLD, siendo la selectividad y sensibilidad adecuadas para la estimación de PAHs a niveles de ng/g. Este procedimiento es uno de los primeros descritos para determinar PAHs a estas concentraciones que evita tediosas y largas operaciones que tendrían por objetivo preconcentrar o purificar los extractos de la MSPD.

9.8 Conclusiones

Este estudio ha mostrado que la presencia de impurezas en los adsorbentes es una limitación seria para la cuantificación de PAHs en procedimientos basados en la MSPD. La inclusión de una etapa adicional de purificación de los extractos recogidos después de esta técnica de extracción es probablemente inadecuada debido a que los propios PAHs constituyen impurezas de las fases extractivas. Por lo tanto, una etapa de clean-up previa en la fase extractiva es necesaria. En este sentido, un simple lavado de la fase con un disolvente orgánico o mezcla de disolventes es insuficiente, especialmente cuando las concentraciones de PAHs esperadas en las muestras están en la parte baja del rango ng/g.

La sonicación del adsorbente en presencia de un disolvente orgánico facilita la liberación de impurezas de las fases. En este trabajo, una doble UAE con THF y acetona eliminó las impurezas del C₁₈ en la etapa de lavado, las cuales, de no realizarse este procedimiento, podrían ser liberadas en la etapa de trituración. Dicho procedimiento permite el procesamiento directo por IT-SPME-HPLC-FLD de los extractos obtenidos por MSPD, siendo la selectividad y sensibilidad adecuadas para estimar PAHs a niveles de ng/g.

La metodología propuesta es simple y rápida (diferentes porciones de adsorbentes pueden ser tratadas simultáneamente), y el consumo de disolvente orgánico está reducido al mínimo. La estrategia descrita ha sido desarrollada con fases extractivas C₁₈, pero es también efectiva para eliminar impurezas de fases de gel de sílice y florisil.

Capítulo 10.

PAHs en sedimentos (Parte 2)

10.1 UAE como técnica de extracción innovadora. Acoplamiento a IT-SPME.

La UAE es una de las técnicas de extracción más interesantes en la actualidad como alternativa a los tratamientos clásicos de las muestras debido a ser eficiente y a la vez económica [313]. Sin embargo, dependiendo de la complejidad de las muestras y de la concentración de compuestos diana en los extractos, dicha técnica requiere una etapa de purificación y/o preconcentración. En este contexto, tratamientos clásicos como la LLE o la SPE son típicamente empleados, pero en los últimos años existe una clara tendencia de reemplazarlos por alguna variante de microextracción. No obstante, la mayoría de los métodos que involucran UAE y microextracción se usa para analizar muestras líquidas. Por ejemplo, la UAE se ha utilizado para incrementar las eficiencias de extracción de la DLLME y la HF-LPME [314]. A su vez, el empleo de ultrasonidos puede ser ventajoso bajo condiciones de extracción específicas. Este es el caso de la microextracción con emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME), en donde se emplea un disolvente de extracción que sea inmiscible para formar una emulsión bajo el empleo de ultrasonidos. Así, se evita el uso de un disolvente dispersivo, siendo ésta una ventaja sobre la DLLME [315]. Por otro lado, el análisis de muestras sólidas por métodos basados en UAE y microextracción no ha recibido mucha atención [316]. Dicho de otra forma, las ventajas potenciales del empleo de técnicas de microextracción para procesar extractos obtenidos por UAE de muestras sólidas no han sido lo suficientemente exploradas.

Como se ha mencionado a lo largo de la Introducción, la IT-SPME es una de las técnicas de microextracción más atractivas, especialmente en combinación con LC, permitiendo que la preconcentración, clean-up y separación puedan realizarse en línea. Aunque su uso implique generalmente el análisis directo de OCs en matrices acuosas, se está empleando cada vez más para muestras sólidas [78,317]. El grupo de investigación MINTOTA ha trabajado en el desarrollo de técnicas en donde la IT-SPME se utiliza para procesar extractos obtenidos de la MSPD (como en el Capítulo 9 de la presente Tesis). En esta metodología (comentada en la sección 1.4 de la Introducción) un volumen de muestra tan elevado como la sensibilidad así lo requiera puede ser procesado. El análisis se ha extendido a diferentes clases de contaminantes en muestras de sedimentos y biota [73,318].

En el Capítulo 9, se optimizó y mejoró un procedimiento para la determinación de PAHs en sedimentos marinos que combina MSPD e IT-SPME (en válvula) empleando la UAE en una etapa previa de lavado de las fases extractivas de la MSPD con disolventes orgánicos. Se demostró que dicha metodología se podía aplicar a la cuantificación de estos analitos a niveles de ng/g. En este capítulo, un método basado en la UAE-IT-SPME-HPLC-FLD (i.e. utilizando la UAE como técnica de extracción principal) ha sido desarrollado para la determinación de PAHs (nuevamente seleccionados como analitos diana) a los mismos niveles de concentración. La combinación UAE-IT-SPME puede ser vista como una

alternativa a la MSPD-IT-SPME (ambos procedimientos serán contrastados posteriormente). Cabe reiterar que los PAHs no son ECs en estricto rigor, pero que esto no implica que los métodos propuestos puedan aplicarse a contaminantes relacionados (derivados u otros PAHs) que sí constituyan ECs o en matrices donde los PAHs se puedan considerar emergentes [15]. Para mayor información, ver el Anexo 8.

10.2 UAE-IT-SPME-HPLC-FLD. Condiciones específicas de determinación.

En el capítulo 3 dedicado a la Metodología Experimental, se han comentado las diferentes técnicas involucradas en el método propuesto. El principio de la técnica de extracción (UAE) ha sido discutido en la sección 3.3.1.3 y en la Introducción, aunque la optimización de algunos parámetros será tratada a lo largo del presente capítulo. Por su parte, la HPLC-FLD y el acoplamiento de ésta a la IT-SPME se han explicado en las secciones 3.2.3.1 y 3.3.2.1 respectivamente. Por último, las condiciones experimentales y el detalle de las muestras se pueden encontrar en las secciones 3.5 y 3.6 respectivamente.

Existen diferencias a nivel de equipos y de condiciones en la metodología desarrollada en este capítulo y en la del anterior. Aunque los equipos son los mismos, en el presente estudio se instaló en el sistema un compartimento termostatzado que permite mantener a una temperatura constante y seleccionada a la columna analítica. Por otro lado, los patrones de PAHs se prepararon por dilución en MeCN (en el Capítulo 9, los patrones se prepararon de manera distinta) y se procesaron de una manera que se comentará más adelante.

En cuanto a las composiciones del gradiente, éstas fueron prácticamente las mismas a excepción de la composición inicial de la fase móvil (20:60:20 (v/v/v) de agua-MeOH-MeCN). Esta composición se mantuvo constante hasta el min 8 y luego, el contenido de MeCN se incrementó para alcanzar el 100% al min 16. MeCN al 100% fue la fase móvil hasta el término del análisis. Por su parte, el flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min en el intervalo de 0-8 min, luego fue subido linealmente a 1.5 mL/min hasta el min 16. A continuación, el flujo se dejó constante hasta el final.

Las condiciones del detector fueron un tanto diferentes. En el capítulo precedente la λ_{ex} nunca fue cambiada (265 nm), al igual que las λ_{em} (335, 375, 425 y 475 nm). En este estudio, la λ_{ex} se fijó a 235 nm en el intervalo de 0-7 min para alcanzar una máxima respuesta para el Naf; de 7 min hasta el final de cada análisis, se cambió a 265 nm. Las λ_{em} fueron 335, 375, 425 y 475 nm de 0-10.5 min; de 10.5 min hasta el final, 335 nm se cambió por 515 nm (para una mejor identificación y determinación del IncdP). En la **Tabla 51** se muestran los pares de longitudes de onda óptimas escogidos para la cuantificación de cada PAHs.

Tabla 51. Condiciones de cuantificación del detector en el método desarrollado.

Compuesto	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)					
	235/335	265/335	265/375	265/425	265/475	265/515
Naf	X					
Acn		X				
Fl		X				
Fen			X			
Ant			X			
Flr					X	
Pir			X			
BaA				X		
Cri			X			
BbF				X		
BkF				X		
BaP				X		
DahA				X		
BghiP				X		
IncdP						X

En lo que respecta a la IT-SPME y la inyección cromatográfica, después de inyectar los 3 mL de muestra, se lavó con 200 μ L de agua (y no, 100 μ L) para eliminar posibles interferentes y disolución remanente. Luego de realizar dicha inyección de manera convencional (la explicación se puede ver en la sección 3.3.2.1 de la Metodología Experimental) al min, la válvula se giró a la posición de “carga” y se lavó el capilar sucesivamente con 100 μ L de MeCN y 200 μ L de agua.

10.3 Compatibilidad de los disolventes utilizados en la UAE con la IT-SPME

Como se ha dicho anteriormente, diferentes procedimientos para el análisis de OCs en muestras sólidas por MSPD-IT-SPME se han desarrollado [73,78,318], incluido la metodología del capítulo precedente. En estos estudios, se ha utilizado MeCN como

disolvente para desorber los analitos de los adsorbentes de la MSPD. Para facilitar el paso de los compuestos analizados a la fase extractiva del capilar IT-SPME, se añadió agua a los extractos de la MSPD. De esta forma, los extractos pueden ser procesados directamente por IT-SPME sin tener que realizar etapas adicionales de evaporación y de reconstitución. Por ejemplo y para el análisis de PAHs en biota, la adición de 3.6 mL de agua a los 0.8 mL de extracto (MeCN como disolvente) obtenidos de la MSPD proporcionaron las respuestas más elevadas por analito [73].

En este estudio, como el disolvente utilizado en la UAE juega un papel importante en la eficiencia de extracción de los analitos, la posibilidad de procesar por IT-SPME disoluciones de PAHs preparadas en otros disolventes miscibles con agua fue evaluada. Se ensayaron como disolventes: MeOH, acetona, isopropanol y EtOH. Los resultados obtenidos se compararon con los conseguidos empleando MeCN. Mezclas de 0.8 mL de disolvente orgánico y 3.6 mL de agua [73] se fortificaron con 50 μ L de patrón de PAHs preparado en MeCN conteniendo 100 ng/mL de cada PAHs (resultando en una concentración final de 1.12 ng/mL para cada compuesto). Luego, alícuotas de las disoluciones fortificadas se cargaron en el sistema de IT-SPME en válvula y analizaron por cromatografía.

Experimentos preliminares mostraron que las respuestas (áreas de pico) obtenidas para la mayoría de los PAHs ensayados al procesar 3 mL de mezclas isopropanol/agua en el capilar de IT-SPME fueron significativamente más bajas comparadas a las otras mezclas disolvente/agua. Cuando se procesaron 4 mL de las disoluciones de trabajo, las áreas de pico aumentaron en el caso de la mezcla isopropanol/agua, pero no de manera significativa en los otros casos. En consecuencia, en ensayos posteriores y sólo para la mezcla isopropanol/agua el volumen de muestra fue de 4 mL.

En la **Figura 112** se presentan las respuestas conseguidas para cada compuesto con los disolventes ensayados. Dado a que las áreas de pico absolutas para los 15 PAHs fueron bastante diferentes, se utilizaron áreas de pico normalizadas. Estas últimas fueron calculadas para cada analito tomando como referencia el valor máximo obtenido entre los 5 disolventes empleados, al que se le asignó arbitrariamente el valor de 100. Los compuestos fueron representados en orden creciente de t_r , un parámetro que puede ser utilizado como una estimación de sus polaridades bajo condiciones cromatográficas de fase reversa [73].

Los resultados de la **Figura 112** indican que todos los disolventes ensayados son compatibles con la IT-SPME. En general, las respuestas obtenidas para un analito en particular fueron muy similares en todos los casos, pero áreas de pico significativamente menores fueron observadas cuando se empleó MeCN para los PAHs más polares (i.e. los primeros en eluir, e.g. Naf, Acn y Fl).

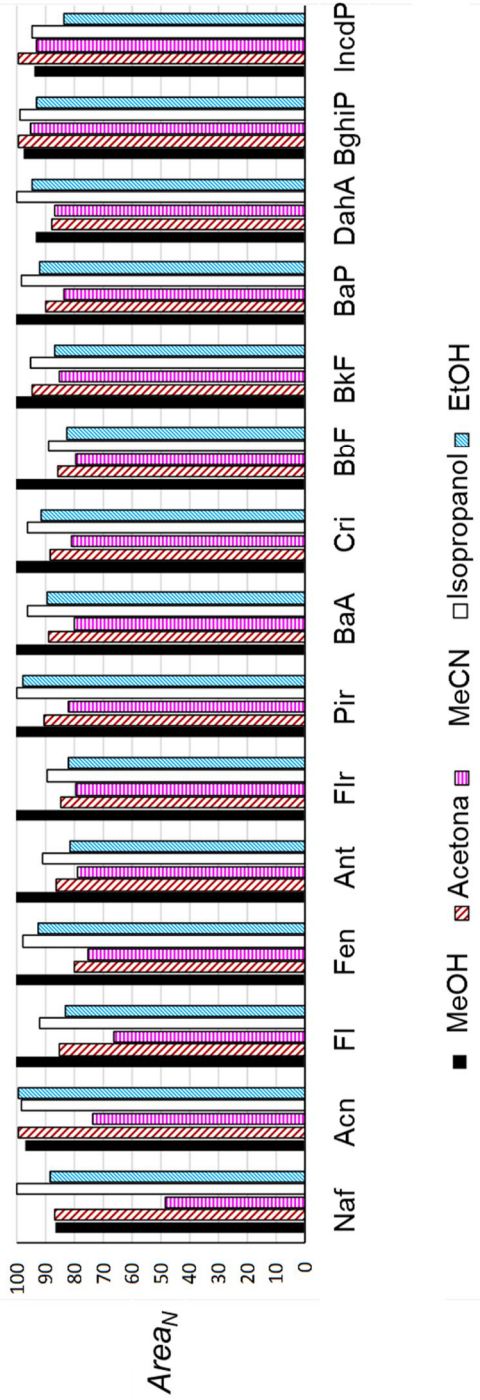


Figura 112. Áreas de pico normalizadas ($Area_N$) obtenidas para disoluciones patrón de PAHs (1.12 ng/mL) en diferentes mezclas de disolvente/agua procesadas por IT-SPME. Volumen procesado: 4 mL para isopropanol/agua y 3 mL para las otras mezclas.

10.4 Optimización de las condiciones de la UAE

El efecto de la naturaleza y volumen del disolvente de extracción, el tiempo de sonicación y la temperatura sobre las respuestas de los analitos fueron estudiados utilizando porciones de 0.3 g de sedimentos marinos naturalmente contaminados.

De hecho, el aumento del volumen de extracción para la UAE incrementa la cantidad absoluta de los analitos extraídos, lo que tiene un efecto positivo en aquellos protocolos que involucran una parcial o total evaporación del disolvente. Sin embargo, en el método desarrollado, los extractos obtenidos por UAE son directamente procesados en el sistema IT-SPME. Por lo tanto, un volumen mínimo de disolvente debería ser empleado en la etapa de UAE con el objetivo de evitar una dilución excesiva de los PAHs en los extractos que se procesarán por IT-SPME. Para una cantidad de muestra de 0.3 g, se encontró que 1.2 mL era el volumen mínimo de disolvente de extracción que aseguraba que, después de la centrifugación (ver sección 3.3.1.3 de la Metodología Experimental), 0.8 mL pudieran ser recogidos del vial para la IT-SPME subsiguiente. Cuando el volumen de extracción fue aumentado a 2 mL, las áreas de pico conseguidas para todos los PAHs fueron menores sin importar la naturaleza del disolvente, el tiempo de sonicación y la temperatura usada. Por consiguiente, un volumen de extracción de 1.2 mL fue seleccionado.

El efecto del disolvente de extracción en las respuestas de los analitos para un tiempo de extracción de 10 min y 30°C se muestra en la **Figura 113**. En esta figura se representan las áreas de pico tanto absolutas (**Figura 113 a**) como normalizadas (**Figura 113 b**). Como se puede observar, las eficiencias de extracción más elevadas para la mayoría de los PAHs se consiguieron con MeCN, especialmente para los más apolares. Sin embargo, las respuestas obtenidas para los compuestos más polares (Naf, Acn y Fl) fueron significativamente menores que las conseguidas con acetona y MeOH. Esto se puede explicar parcialmente en lo comentado en la sección anterior sobre la menor eficiencia en IT-SPME obtenida para el MeCN. Para los PAHs más polares, las mejores respuestas se dieron al trabajar con MeOH. Eso sí, con este disolvente las eficiencias de extracción observadas para los compuestos más apolares fueron mucho más bajas que las obtenidas no sólo para MeCN, sino también para acetona. Esta última proporcionó respuestas intermedias para todos los compuestos ensayados (excepto el Naf), mientras que con EtOH e isopropanol las respuestas fueron bajas para todos los PAHs.

El efecto del tiempo de extracción en las respuestas del método fue evaluado en un intervalo de 10-60 min. Los resultados obtenidos para los tres disolventes que habían proporcionado las respuestas más altas en el estudio previo (MeOH, acetona y MeCN) a una temperatura de 30 °C se presentan en la **Figura 114**. Como se observa, aumentar el tiempo de extracción tuvo un efecto positivo en las respuestas sólo hasta los 30 min. No se encontró una mejoría sustancial al extender este tiempo hasta 60 min.

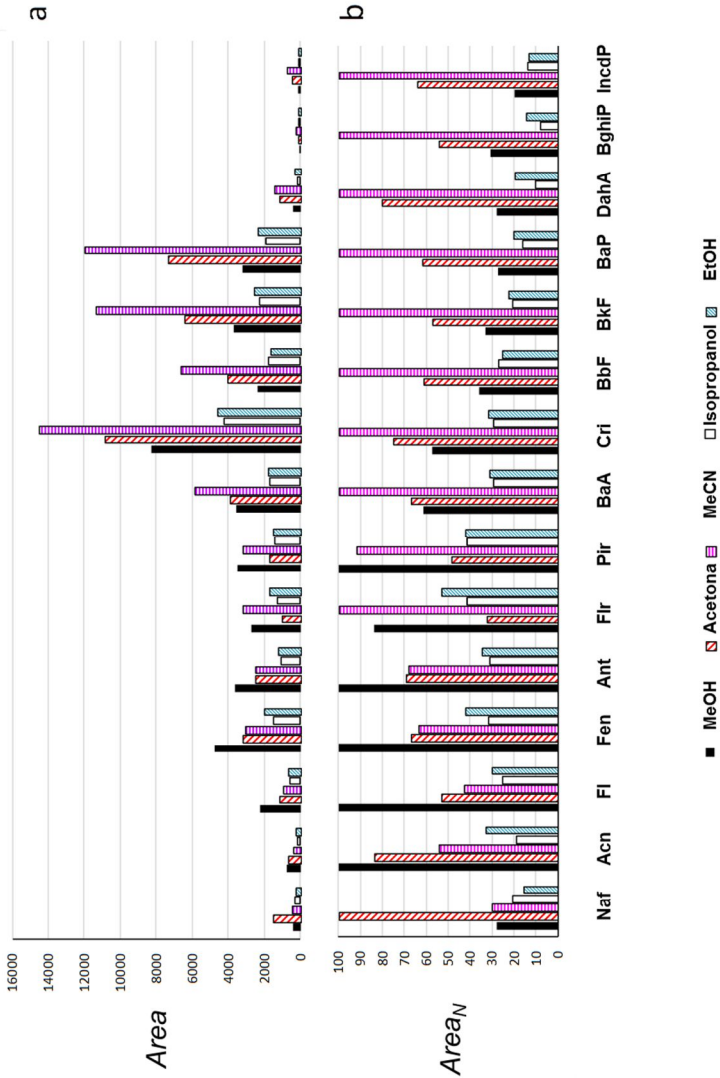


Figura 113. Respuestas obtenidas para sedimentos marinos contaminados naturalmente procesados por UAE con diferentes disolventes: (a) áreas de pico absolutas (Area) y (b) áreas de pico normalizadas (Area_N). Condiciones: tiempo de extracción de 10 min, temperatura de extracción de 30°C.

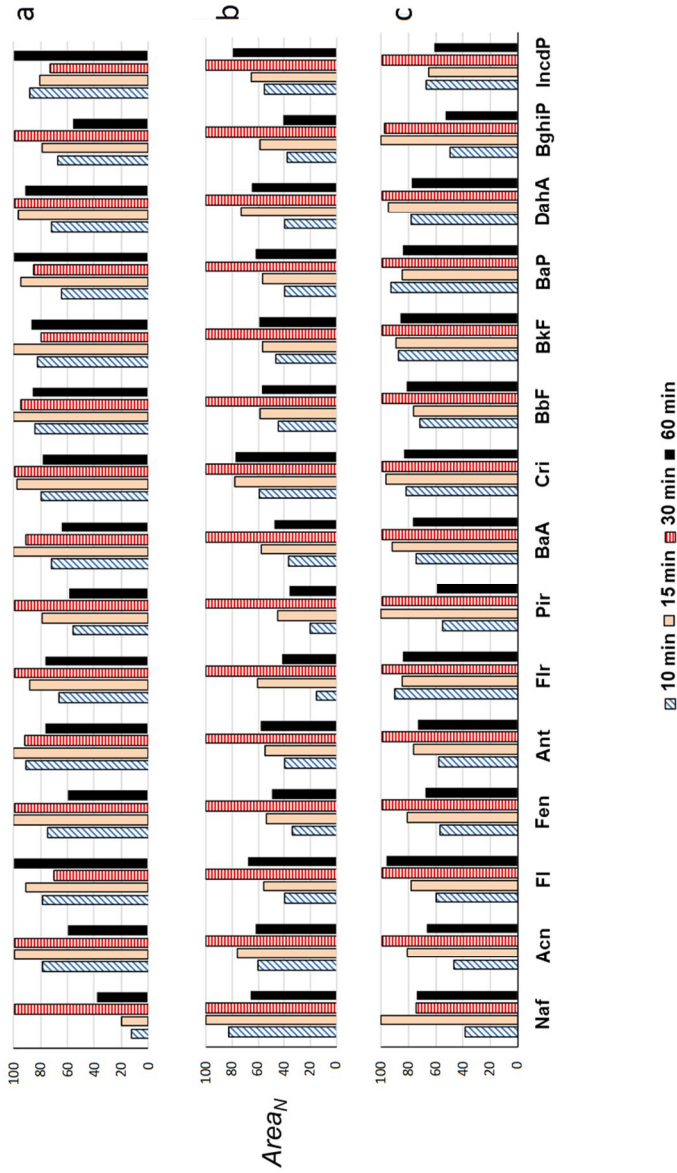


Figura 114. Respuestas obtenidas (Áreas de pico normalizadas, Area_N) para sedimentos marinos contaminados naturalmente procesados por UAE con diferentes tiempos de extracción (i.e. sonicación) para: (a) MeOH, (b) acetona y (c) MeCN. Temperatura de extracción de 30°C.

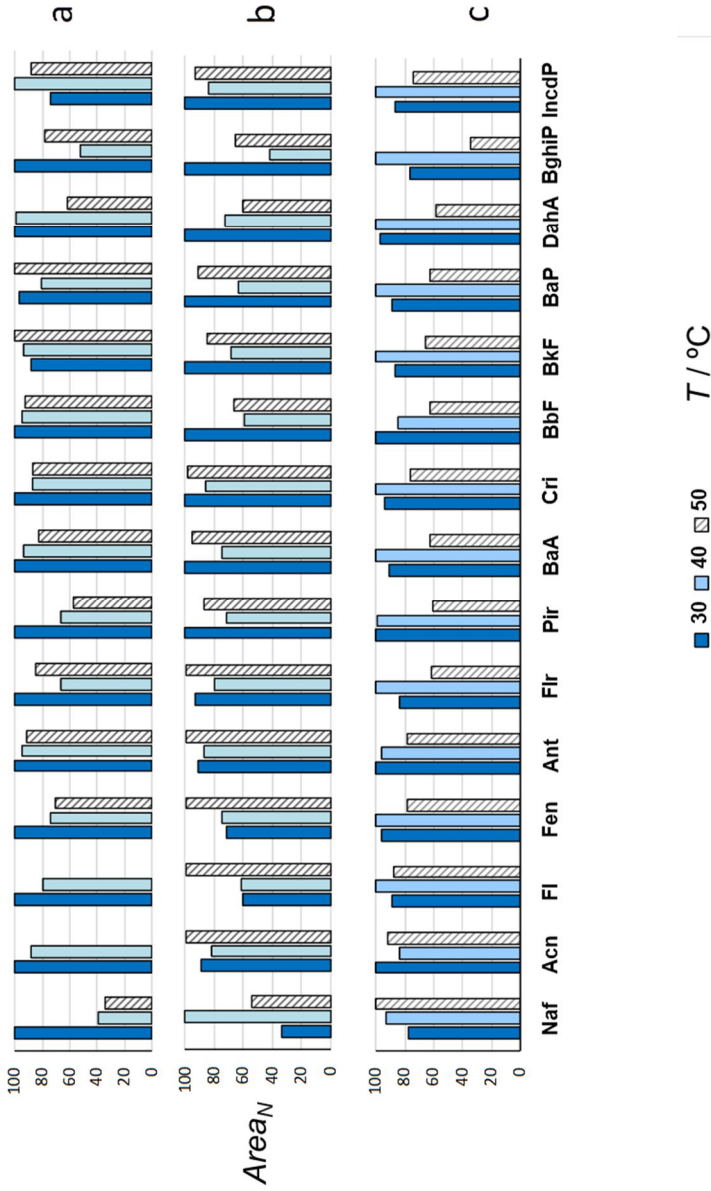


Figura 115. Respuestas obtenidas (Áreas de pico normalizadas, Area_N) para sedimentos marinos contaminados naturalmente procesados por UAE con diferentes temperaturas (T) de extracción para: (a) MeOH, (b) acetona y (c) MeCN. Tiempo de extracción de 10 min.

Por otra parte, áreas de pico similares se hallaron a 30°C y 40°C para la mayoría de los PAHs estudiados; un incremento mayor (hasta 50°C) tuvo un efecto negativo en las respuestas de los analitos (ver **Figura 115**).

De acuerdo con la literatura, tiempos de extracción elevados y/o temperaturas altas causan una reducción en el tamaño de la materia orgánica particulada que pueda estar presente en las muestras, y por ende en su área superficial, la que a su vez facilita la adsorción de los PAHs en estas matrices [319]. Este hecho podría explicar las pobres eficiencias de extracción observadas en la etapa de IT-SPME bajo la más alta temperatura y el mayor tiempo de sonicación.

Finalmente, debido a que ningún disolvente por sí solo proporcionó las respuestas más elevadas tanto para los PAHs polares como los apolares simultáneamente, se ensayaron diferentes mezclas de disolventes de extracción bajo las condiciones optimizadas (tiempo de sonicación de 30 min y temperatura de extracción de 30°C). En términos generales, el empleo de una mezcla de MeCN y acetona (1:1 (v/v)) proporcionó las mejores respuestas para la amplia mayoría de los PAHs analizados. Se encontró también que la adición de una pequeña cantidad de isopropanol en la mezcla de extracción reducía la presencia de compuestos de la matriz en los cromatogramas resultantes (posibles interferencias).

En base a los resultados descritos anteriormente, las condiciones finales para el método desarrollado son las siguientes: una cantidad de muestra (0.3 g) se somete a UAE en presencia de 1.2 mL de una mezcla de MeCN:acetona:isopropanol (47.5:47.5:5 (v/v/v)) durante 30 min y a 30°C. Después de centrifugar, 0.8 mL del sobrenadante se mezclan con 3.6 mL de agua. Finalmente, 3 mL de la mezcla resultante se introducen directamente en el sistema IT-SPME-HPLC-FLD para que se produzca la correspondiente preconcentración, clean-up, separación y detección.

10.5 Validación del método propuesto

Para evaluar la eficiencia del método propuesto, un sedimento marino fue analizado. Porciones de esta muestra (0.3 g) fueron fortificadas con concentraciones conocidas de los analitos estudiados para estar en el intervalo de 3.3-33.3 ng/g, y luego se sometieron al procedimiento UAE-IT-SPME-HPLC-FLD con el fin de obtener los parámetros analíticos relevantes como linealidad, recuperaciones, reproducibilidad, LODs y LOQs (ver **Tabla 52**). Cabe mencionar que bajo estas condiciones, la concentración de cada PAH en las disoluciones procesadas por IT-SPME estuvieron en el rango de 0.15-1.50 ng/mL (para un 100% hipotético de recuperación). Naf, Fen, Flr y Pir estuvieron presentes en la muestra estudiada sobre sus LOQs (ver **Figura 116**); en cambio, BaA, BbF, BkF, BaP fueron sólo detectados (i.e. concentraciones bajo los LOQs).

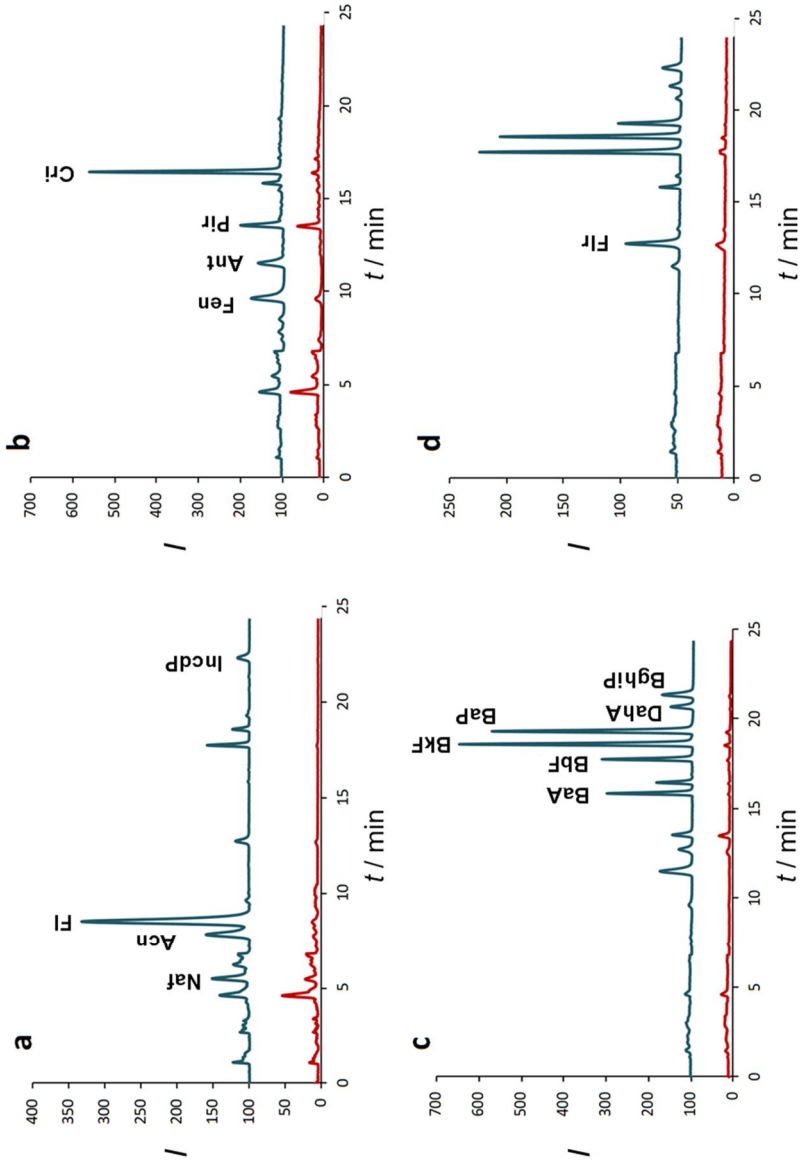


Figura 116. Cromatogramas obtenidos por el método UAE-II-SPME-HPLC-FLD propuesto para un sedimento marino fortificado con PAHs (8.33 ng/g de cada compuesto). λ_{ex} : 235 nm en el intervalo 0-7 min y 265 nm desde 7 min hasta el final del análisis. λ_{em} : (a) 335 nm en el intervalo de 0-10.5 min y 515 nm desde 10.5 min hasta el final del análisis; (b) 375 nm; (c) 425 nm; (d) 475 nm. Muestra, línea roja (cromatogramas de abajo); muestra fortificada, línea azul (cromatogramas de arriba).

Tabla 52. Parámetros analíticos para la determinación de PAHs en sedimentos marinos.

Compuesto	y = a + bx (n=8)			Rec. ¹ (%)	RSD ² (%)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
	a	b	r				
Naf	157 ± 23	168 ± 5	0.997	104	39	0.3	1.0
Acn	110 ± 57	399 ± 12	0.997	110	26	0.2	0.75
Fl	-28 ± 137	1713 ± 27	0.999	98	5	0.06	0.2
Fen	286 ± 69	508 ± 15	0.997	96	10	0.2	1.0
Ant	87 ± 143	524 ± 23	0.995	91	6	0.2	0.75
Flr	156 ± 20	218 ± 4	0.999	102	5	0.3	1.0
Pir	498 ± 75	251 ± 16	0.988	85	11	0.2	0.75
BaA	177 ± 136	535 ± 24	0.994	96	11	0.06	0.2
Cri	434 ± 266	1229 ± 57	0.994	89	15	0.03	0.1
BbF	199 ± 97	578 ± 18	0.997	91	10	0.06	0.2
BkF	128 ± 79	1691 ± 40	0.998	89	12	0.03	0.1
BaP	769 ± 438	1184 ± 80	0.987	75	19	0.03	0.1
DahA	93 ± 60	171 ± 13	0.983	84	12	0.2	0.75
BghiP	129 ± 79	257 ± 21	0.984	85	24	0.2	0.75
IncdP	29 ± 16	89 ± 2	0.998	84	9	0.5	1.5

¹Recuperación de la UAE-IT-SPME-HPLC-FLD calculada como la razón de señales obtenidas para una muestra fortificada y para un patrón conteniendo una concentración equivalente para cada PAHs procesado directamente por IT-SPME-HPLC-FLD. ²Intradía (n=4).

Como se observa en la **Tabla 52**, la linealidad fue satisfactoria para todos los compuestos estudiados en concentraciones hasta 33.3 ng/g. Éstas son concentraciones que se pueden esperar en muestras de sedimentos reales con niveles medios de contaminación por PAHs. Sin embargo, se pueden encontrar concentraciones más elevadas dependiendo del origen y del grado de contaminación [222,223]. En sedimentos muy contaminados, una

reducción de la cantidad de muestra es necesaria para no saturar al detector, especialmente para los PAHs que exhiben mayor intensidad de fluorescencia (e.g. Fl y BkF, ver valores de pendiente (b) en la **Tabla 52**). Bajo las condiciones propuestas, no se observaron diferencias significativas entre procesar 0.1 g y 0.3 g de muestra (fortificados para contener la misma concentración por PAHs). Adicionalmente, para analitos que presentaban mayores señales que los límites superiores de calibración, los extractos tuvieron que ser diluidos convenientemente en la mezcla de disolventes MeCN:acetona:isopropanol (47.5:47.5:5 (v/v/v)).

La reproducibilidad (evaluada como RSD, intradía) fue también satisfactoria para la mayoría de los compuestos teniendo en cuenta las concentraciones ensayadas ($RSD \leq 26\%$, excepto para el Naf). Para este analito, la explicación del elevado valor observado puede encontrarse en el hecho que el ruido instrumental a sus condiciones de detección óptimas era mucho más alto que el que se tuvo para los otros compuestos.

Los porcentajes de recuperación fueron calculados comparando las pendientes de calibración obtenidas para muestras fortificadas (**Tabla 52**) con las conseguidas procesando directamente en el sistema IT-SPME-HPLC-FLD disoluciones patrón conteniendo concentraciones equivalentes para cada analito (en un rango de 0.13-1.3 ng/mL establecido teniendo en cuenta la recuperación de los PAHs y la saturación de las señales). Las recuperaciones fueron adecuadas, siendo los valores estimados cercanos o superiores a un 85% para la mayoría de los PAHs (a excepción del BaP, ver **Tabla 52**). Cabe resaltar que dichas recuperaciones mostraron una tendencia a disminuir cuando la polaridad de los analitos también lo hacía.

Por otra parte, se obtuvieron las recuperaciones absolutas (que se pueden considerar como las eficiencias de extracción calculadas en capítulos anteriores) para los sedimentos fortificados comparando con las respuestas obtenidas para inyecciones directas de patrones (sin IT-SPME, empleando un loop de acero de 20 μ L). Estas recuperaciones (mostradas en la **Tabla 53**) estuvieron en el intervalo de 25-51%, valores consistentes con los de la bibliografía y considerando que una metodología basada en la IT-SPME está siendo empleada [78]. La **Tabla 52** también muestra los LODs y LOQs, establecidos a partir de las curvas de calibrado, estando entre 0.03-0.5 ng/g y entre 0.1-1.5 ng/g respectivamente.

Las condiciones propuestas fueron aplicadas a la determinación de PAHs en un sedimento marino en un estudio interlaboratorio. En este estudio, se establecieron valores de consenso para cada analito de acuerdo con los resultados reportados por los grupos participantes. En vez de utilizar una desviación estándar, cada resultado fue caracterizado por un error total compuesto de un error proporcional (valor de 12.5% para todos los analitos) y un error constante que varió entre 0.05 y 0.5 ng/g dependiendo del compuesto. El valor verdadero estaba dentro del intervalo (valor de consenso $\pm 2 \cdot$ error total). El mismo

criterio se aplicó a la información obtenida de las muestras analizadas por el método propuesto.

Tabla 53. Recuperaciones absolutas (i.e. eficiencias de extracción) en el método UAE-IT-SPME-HPLC-FLD propuesto.

Compuesto	Rec. Absoluta ¹ (%)
Naf	33
Acn	45
Fl	45
Fen	45
Ant	40
Flr	34
Pir	42
BaA	35
Cri	44
BbF	42
BkF	34
BaP	44
DahA	40
BghiP	51
IncdP	32

¹Recuperación del método desarrollado calculada como la razón de señales obtenidas para sedimentos fortificados y para un patrón conteniendo concentraciones equivalentes para cada PAHs inyectados directamente (20 µL) al sistema cromatográfico.

La **Tabla 54** resume los resultados obtenidos del estudio interlaboratorio. Como se aprecia en esta tabla, los resultados conseguidos por el método desarrollado son estadísticamente equivalentes a los valores de consenso para todos los analitos cuantificados (a excepción del Fen). Por lo tanto se puede concluir que la metodología propuesta proporciona una exactitud adecuada.

Tabla 54. Evaluación de la exactitud del método UAE-IT-SPME-HPLC-FLD para la determinación de PAHs en sedimentos marinos.

Compuesto	Concentración asignada ¹ (ng/g)	Error Total (ng/g)	Concentración determinada ² (ng/g)	Error Total (ng/g)
Naf	71	9	46	6
Acn	14	2	22	3
Fl	22	3	14	2
Fen	118	15	67	9
Ant	31	4	46	6
Flr	147	18	156	20
Pir	123	15	130	16
BaA	83	10	81	10
Cri	69	9	106	13
BbF	118	15	75	10
BkF	53	7	40	5
BaP	83	10	97	12
DahA	18	2	19	2
BghiP	92	12	60	8
IncdP	96	12	90	11

¹Valor de consenso. ²Valor determinado por el método propuesto para n=3.

10.6 Utilidad del método desarrollado

Como ya se ha discutido en la Introducción (**Tabla 20** de la sección 1.5.5.1) y de acuerdo a los resultados globales presentados en este capítulo, la metodología UAE-IT-SPME-HPLC-FLD propuesta es comparable en cuanto a figuras de mérito se refiere con los métodos reportados en la literatura [222-231]. La principal ventaja del presente método es que el extracto obtenido puede ser directamente procesado por lo que no se tienen que realizar etapas adicionales de evaporación, reconstitución o re-extracciones. A su vez, la instrumentación requerida es muy simple y no se necesita de montajes complejos como para otras técnicas.

Si se compara con el método estudiado en el Capítulo 9 (MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD), la gran ventaja de la metodología del presente estudio es que la manipulación por parte del operario se ve significativamente reducida. La MSPD involucra trituración manual de la muestra y el adsorbente, seguido de la transferencia de la mezcla resultante a un cartucho de SPE donde se realiza la desorción de los analitos. Además, este adsorbente debe ser lavado siguiendo el protocolo descrito en el capítulo anterior. Aunque la UAE para la metodología presentada en este capítulo requiere más tiempo (30 min), múltiples muestras pueden ser procesadas simultáneamente en el baño de ultrasonidos. Por otro lado, el consumo de disolventes y materiales se ve drásticamente disminuido. En el presente método, sólo se requieren 1.2 mL de disolvente de extracción y 3.6 mL de agua por muestra.

Cabe destacar que los capilares de IT-SPME de ambas metodologías pueden reutilizarse más de 100 veces sin observarse deterioro o pérdida del desempeño analítico. Finalmente y dependiendo de los objetivos planteados en cada capítulo, se puede afirmar que los dos métodos cumplen en cuanto a permitir el análisis de PAHs a niveles de ng/g en sedimentos. La comparación realizada tiene una finalidad meramente ilustrativa puesto que se trata de dos situaciones diferentes: la optimización de un método ya aplicado a otras matrices y el desarrollo de uno nuevo.

10.7 Conclusiones

La combinación de UAE e IT-SPME en válvula es una alternativa confiable para el análisis de PAHs en sedimentos marinos. Aunque los PAHs no sean en estricto rigor considerados como ECs, esto no quita la posibilidad de extender el método desarrollado a contaminantes relacionados que sí lo sean. Las condiciones de la UAE permite la extracción eficiente de los compuestos estudiados utilizando pequeñas cantidades de muestra (0.1-0.3 g) y sólo 1.2 mL de disolvente orgánico de extracción por muestra. Los PAHs extraídos pueden ser purificados y concentrados por IT-SPME simplemente añadiendo agua a los extractos. El desempeño analítico de la metodología propuesta es similar al de los reportados en otros métodos recientes de la bibliografía para la cuantificación de PAHs en

suelos y sedimentos. La principal ventaja del procedimiento presentado en este estudio es que el consumo de materiales y reactivos se ve considerablemente reducido, además de no ser necesarios sistemas complejos de extracción. Comparado a la MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD (Capítulo 9), el método propuesto reduce significativamente la manipulación.

Este estudio muestra por primera vez que la IT-SPME es compatible con disolventes de extracción (miscibles en agua) de diferentes polaridades y viscosidades. Por lo tanto, la UAE-IT-SPME (en este caso acoplada a HPLC-FLD) puede ser utilizada a una variedad de matrices sólidas y analitos de naturaleza diversa.

Chapter 11.

PAHs and their derivatives in air samples

11.1 Background information. Different MS modes.

In Chapters 9 and 10, PAHs were studied by different analytical methods which differed in the extraction techniques (one based on MSPD and the other, on UAE). In both approaches, solid samples (e.g. marine sediments) were analyzed. In this chapter, methods involving GC and MS detection are tested to quantify PAHs and their derivatives (which can be considered as ECs) in air samples (these compounds are described in section 1.5.5 of the Introduction). Samples were processed by PLE (this extraction technique has been discussed in section 3.3.1.4 of the Experimental Methodology). The first part consists of the PAH determination by GC-MS (using EI mode). Then, the PAH derivatives are studied by GC-MS (using different ionization modes: EI or CI) and also by GC-MS/MS (using EI mode) in order to compare the analytical performance of these 3 methods. The experimental conditions can be seen in **Table 23** of the section 3.5 of the Experimental Methodology.

As stated in section 3.2.3.4 of the Experimental Methodology, 3 different GC systems were used. As for the ionization mode, EI and CI were tested (in GC-MS). The chemical reactions for both processes (EI and positive CI, PCI) are displayed in **Figure 117**. EI is the classical mode of ionization and it is best suited to relatively non-polar and volatile compounds. It is useful for structural characterization as the EI mass spectrum usually contains the molecular ion, but also many fragments (it is a more energetic process than CI). It is commonly used for the determination of PAHs and the study performed in this Thesis is not an exception. However, for PAH derivatives it has been documented that, unless special preconcentration of the compounds is carried out, sufficient detection sensitivity might not be achieved [237]. Thus, GC-MS/MS (more sensitive than GC-MS) can be used or negative CI (NCI) which may bring both the required sensitivity and specificity for PAH derivatives.

CI (restricted to relatively volatile samples) is a softer technique than EI. Moreover, CI is better suited than EI to ionize more polar compounds (PAH derivatives are more polar than PAHs due to the presence of functional groups such as nitro and hydroxyl, among others). A CI mass spectrum often contains a protonated molecule and a few fragment ions. Ions (positives and negatives) are produced through the collision of the analytes with ions of a reagent gas (in this case, methane) that are present in the ion source.

Chemical ionization is either positive or negative [320]. Almost all neutral analytes can form positive ions through the reactions described in **Figure 117**. In order to see a response by NCI, the compound must be capable of producing a negative ion (i.e. stabilize a negative charge) for example by electron capture ionization (also, shown in **Figure 117**). Because not all analytes can do this, using NCI provides a certain degree of selectivity that is not available with other, more universal ionization techniques (e.g. EI and PCI).

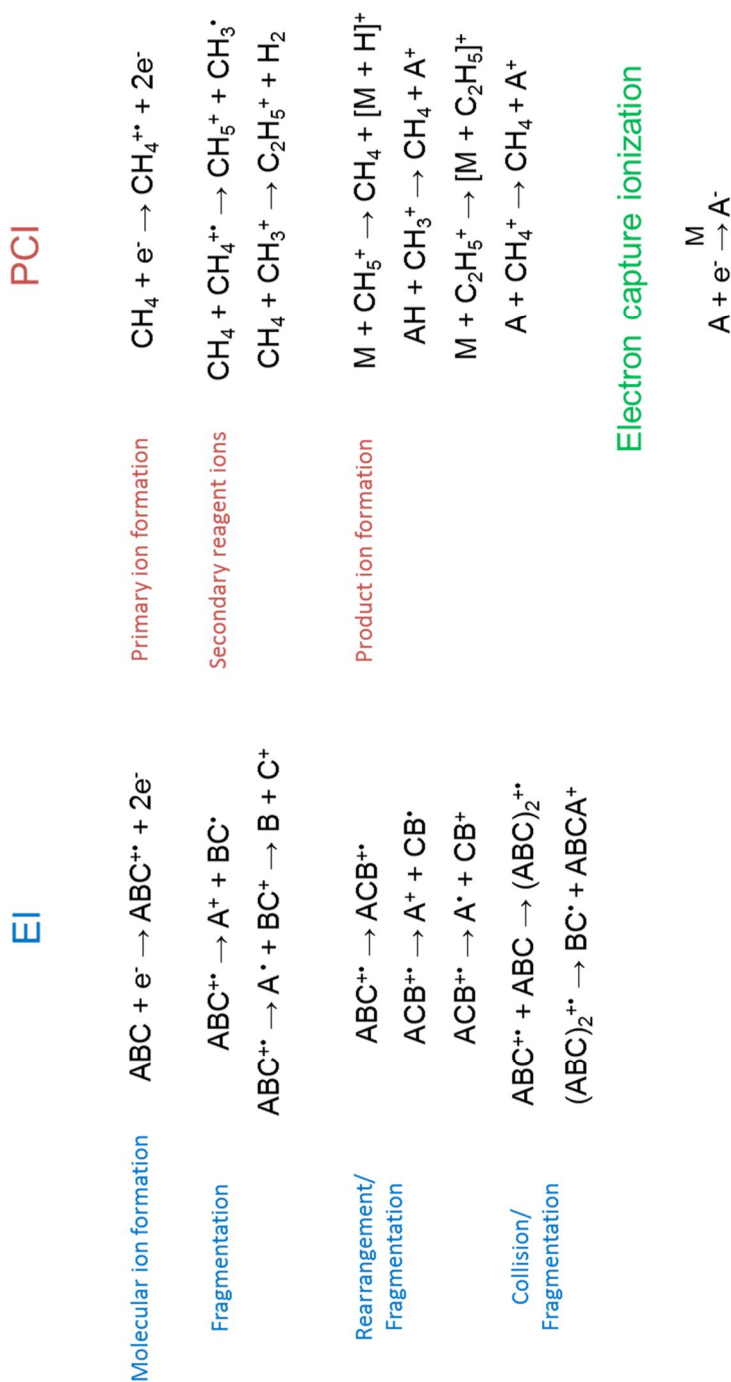


Figure 117. Chemical reactions for the different processes of ionization (EI and PCI). Electron capture ionization is represented as it may occur in NCI.

As for the MS acquisition, two modes were mainly used: full scan and SIM (MRM was used for the optimization of collision energies in GC-MS/MS, see section 3.2.3.2 of the Experimental Methodology). Full scan mode allows for monitoring a range of masses (known as mass to charge ratio, m/z) over a set period of time. A total ion current plot (TIC) is obtained from this analysis. This mode is quite useful for identifying unknown compounds in a sample and for screening purposes. On the other hand, in SIM mode analytes are detected with an increased sensitivity compared to full scan mode. Here, the MS detector gathers data for masses of interest rather than looking for all masses over a wide range (as in full scan). Typically two to four ions are monitored per compound. Therefore, the SIM plot is more specific than the TIC (only analytes with selected masses are detected).

11.2 GC-MS for the determination of PAHs

11.2.1 System optimization

The experimental conditions for the GC-MS system (ionization mode: EI) are displayed in **Table 23** (see section 3.5 of the Experimental Methodology). However, two sets of parameters have not been discussed yet: the oven temperature program and the selected m/z for the studied PAHs. After proper optimization, the resulting oven temperature program is depicted in **Figure 118**. As for the selected m/z , they can be seen in **Table 55**. Naphthalene d-8 (Naf d-8) was used as internal standard (IS). Naf was not quantified by this method, although it was detected.

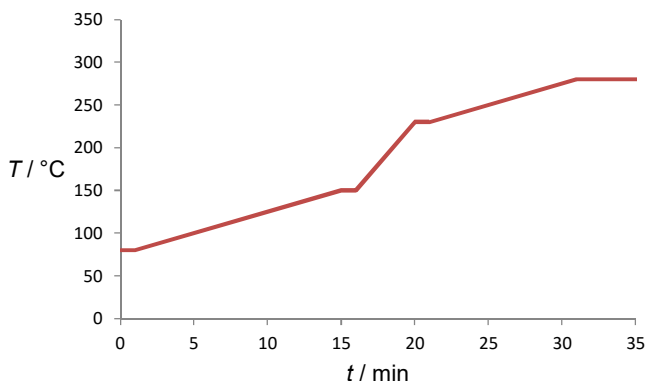


Figure 118. The oven temperature program used in the GC-MS method for the determination of PAHs.

Before choosing the m/z for each PAH, individual standards were injected in order to determine the t_r of each compound. Then, a standard containing all the analytes was processed and the more intense fragment for each compound was selected as m/z for quantification purposes. All these studies were performed in full scan mode. For further experiments, the system mode of detection was switched to SIM.

Table 55. Selected m/z for the studied PAHs

Compound	m/z
Naf	128
Naf d-8 (IS)	136
Acn	154
Fl	166
Fen	178
Ant	178
Flr	202
Pir	202
BaA	228
Cri	228
BbF	252
BkF	252
BaP	252
DahA	278
BghiP	276
IncdP	276

IS: internal standard

11.2.2 Method calibration

The analytical parameters were obtained for the 14 analyzed PAHs working with standards diluted in MeCN. The analytical signal used was the ratio between the obtained peak areas for each PAH and the IS. The calibration curves ($n=6$), R^2 , LODs and LOQs are displayed in **Table 56**. The LODs were obtained experimentally by injecting successive dilutions of a PAH standard (in some cases, individual standards were also processed) until the signal could not be clearly distinguished from the background noise (and from these values, LOQs were estimated). The working range of concentrations was 1-100 ng/mL.

Table 56. Analytical parameters of the proposed GC-MS for PAH determination.

Compound	$y = a + bx$ ($n=6$)			LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	a	b	R^2		
Acn	-0.009 ± 0.008	0.00230 ± 0.00004	0.999	1.2	4.1
Fl	-0.02 ± 0.02	0.00262 ± 0.00009	0.995	0.9	3.1
Fen	-0.04 ± 0.03	0.00111 ± 0.00016	0.995	2.5	8.5
Ant	-0.04 ± 0.03	0.0009 ± 0.0002	0.992	3.1	10.5
Flr	-0.03 ± 0.02	0.00370 ± 0.00009	0.998	0.7	2.2
Pir	-0.04 ± 0.03	0.00383 ± 0.00011	0.997	0.6	2.1
BaA	-0.05 ± 0.02	0.00310 ± 0.00010	0.996	0.7	2.2
Cri	-0.04 ± 0.02	0.00360 ± 0.00010	0.997	0.6	2.1
BbF	-0.033 ± 0.017	0.00281 ± 0.00008	0.997	0.7	2.2
BkF	-0.05 ± 0.02	0.00302 ± 0.00010	0.996	0.7	2.2
BaP	-0.05 ± 0.02	0.00236 ± 0.00010	0.993	0.8	2.6
DahA	-0.03 ± 0.02	0.00246 ± 0.00009	0.996	1.2	3.8
BghiP	-0.06 ± 0.03	0.00100 ± 0.00011	0.996	2.8	9.4
IncdP	-0.027 ± 0.016	0.00245 ± 0.00008	0.996	0.8	2.6

As it can be seen in **Table 56**, linearity was excellent. LODs and LOQs were adequate: they were higher compared to the ones obtained in Chapter 10, but no preconcentration step was performed in this case. A simple GC-MS method for the analysis of PAHs has been established.

11.2.3 Air samples. Validation of the method.

As it has been stated earlier, samples were processed by PLE (described in section 3.3.1.4 of the Experimental Methodology). The details for the air samples are given in section 3.6 of the same chapter. Contaminated glass fiber filters and a CRM (i.e. a solid sample which was conveniently diluted in MeCN and directly injected into the system) were analyzed for testing the accuracy and precision of the proposed methodology. 6 PAHs were studied: Fen, Flr, BaA, BbF, BaP and DahA. Results are shown in **Table 57**. For precision (RSD values), the obtained percentages were satisfactory. The variability for this parameter was higher when filters were analyzed (i.e. when PLE was used). The estimated relative errors were under 20%, thus the accuracy of the method was adequate. Also, for the rest of the analytes precision was evaluated intraday by injecting standards and results (as RSD) were good considering the working range of concentrations (RSD < 10%).

Table 57. Accuracy and precision in the analysis of samples by GC-MS.

Compound	CRM (n=4)		Filters (n=4)	
	RSD (%)	Rel. Error ^a (%)	RDS (%)	Rel. Error ^a (%)
Fen	2.6	11.1	7.8	7.8
Flr	0.6	15	15.3	10.1
BaA	3.6	15	19.3	8.3
BbF	3.2	1.7	2.3	17.8
BaP	1.7	6.7	21.2	0.5
DahA	1.7	10	11.2	11.8

^aRelative Error

11.3 Methods for estimating PAH derivatives

As it is shown in **Table 23** of the Experimental Methodology, 3 methods were used for analyzing PAH derivatives (shown in **Table 19** of the section 1.5.5 of the Introduction): GC-MS/MS (EI), GC-MS (EI) and GC-MS (CI). For the two methods involving EI, the oven temperature program (after proper optimization) was the same; for the CI method it was different. Both programs are depicted in **Figure 119**.

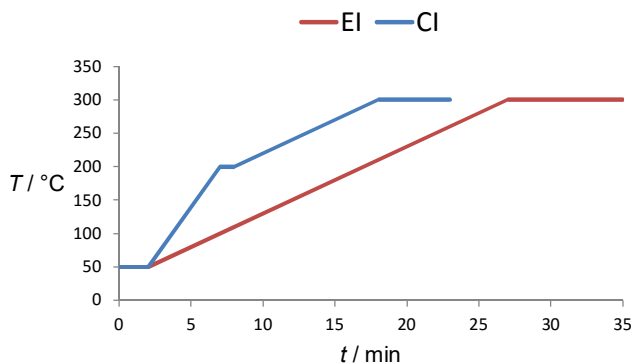


Figure 119. The oven temperature program used in the methods for the determination of PAH derivatives. GC-MS methods involving (red line) EI and (blue line) CI.

11.3.1 GC-MS/MS preliminary studies

In GC-MS/MS, different parameters were optimized in order to achieve the highest response of the analytes in the system: injection volume (1-2 μL) and temperature (250-300°C), as well as the m/z for the precursor and product ions and the collision energies. For identifying each derivative, individual standards were injected. Therefore, the t_r for each compound was obtained. After this, experiments could be done by using standards containing the 15 PAH derivatives. The analyte responses were higher when 2 μL of a standard was injected at a temperature of 250°C. (note: the working concentration for each compound was 5 mg/L)

Full scan was used to find the principal fragmentations for each compound. Then, the most intense ion was chosen as the precursor one. After this, this ion (for each analyte) was filtered in the first quadrupole of the system and a scan of the most intense product ions was performed. Having found the m/z of the needed ions (i.e. precursor and product ions),

calibration by using SRM mode can be done. However, the collision energy must be optimized for having the highest analytical signal (in this case, peak area).

MRM experiments were performed in order to optimize the collision energy for each PAH. The system allowed one to monitor multiple energies in the same chromatographic run. With this, this parameter could be quickly optimized. **Table 58** summarizes the results obtained for the GC-MS/MS optimization (one product ion is shown, the one used for quantification, although several were monitored). A GC-MS/MS chromatogram (10 mg/L for each PAH derivative) is displayed in **Figure 120**. Despite having the same concentration, the response of each analyte was different.

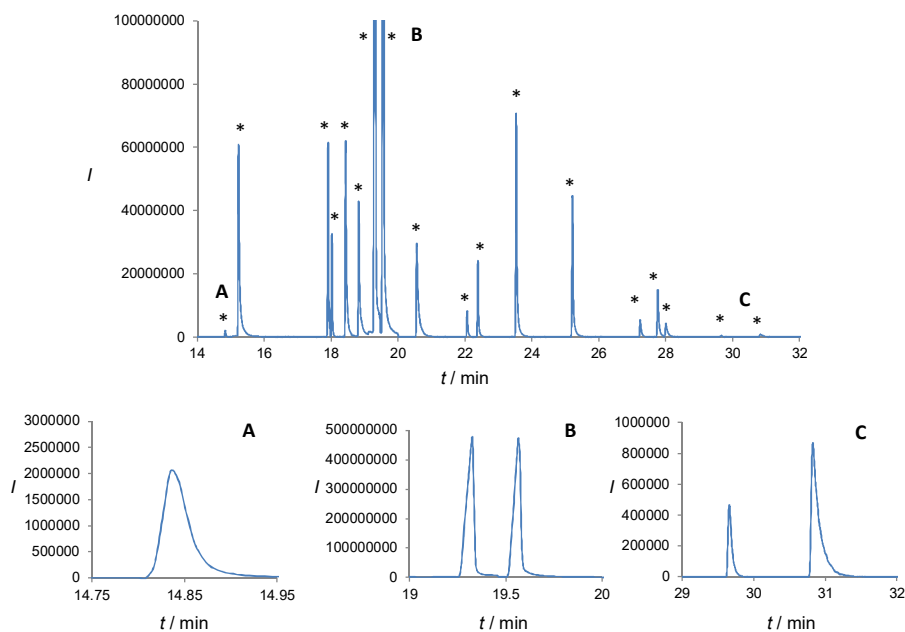


Figure 120. Chromatogram obtained (up) for the 18 PAH derivatives (10 mg/L of each one, marked with *) in GC-MS/MS (EI). Zoom: (A) OH1, (B) O and OH2, (C) N11 and N12. For more details, see Table 58.

Different IS were tested in the GC-MS/MS methodology: Naf d-8, phenanthrene d-10 (Fen d-10), pyrene d-10 (Pir d-10) and chrysene d-12 (Cri d-12). Pir d-10 was the best

choice as it did not interfere with the detection of the analytes and gave a good response in the system (information about the optimization of this IS can also be found in **Table 58**).

Table 58. GC-MS/MS (EI) optimization.

Compound	Family	Key	t _r (min)	Precursor	Product	Collision Energy (V)
				Ions (m/z)		
1,2-dihydroxynaphthalene	OHPAHs	OH1	14.8	160	131	20
2,4-dimethylquinoline	AZAs	A	15.2	157	115	50
1-nitronaphthalene	NPAHs	N1	17.9	173	115	30
2-methyl-1-nitronaphthalene	NPAHs	N2	18.1	186	130	20
2-nitronaphthalene	NPAHs	N3	18.4	173	127	30
6-nitroquinoline	Aza/NPAHs	AN	18.8	116	89	35
9-fluorenone	OPAHs	O	19.3	180	152	45
9-hydroxyfluorene	OHPAHs	OH2	19.6	181	152	45
9-hydroxyanthracene	OHPAHs	OH3	20.6	168	138	40
1,5-dinitronaphthalene	NPAHs	N4	22.1	218	115	10
5-nitroacenaphthene	NPAHs	N5	22.4	169	141	40
Pyrene d-10	PAHs	IS	22.9	105	91	35
9-nitroanthracene	NPAHs	N6	23.5	193	164	30
1,8-dinitronaphthalene	NPAHs	N7	25.2	172	114	40
3-nitrofluoranthene	NPAHs	N8	27.2	217	189	20
1-nitropyrene	NPAHs	N9	27.8	217	189	45
2-nitropyrene	NPAHs	N10	28.1	247	201	25
7-nitrobenzo(a)anthracene	NPAHs	N11	29.7	273	217	30
6-nitrochrysene	NPAHs	N12	30.8	273	215	30

11.3.2 GC-MS (EI and CI) preliminary studies

For GC-MS (EI), the first step consisted of finding the t_r and the m/z for SIM analysis (quantification ion) of the studied compounds. Using full scan mode, the t_r were found by injecting individual standards for each derivative. Later, the m/z were obtained by injecting a standard containing the 19 compounds (including the chosen IS). In the analysis, the OH1 signal suffered peak splitting and was not studied by this technique. In addition, a second m/z for each analyte was selected for identification purposes (the ratio between the signals of the quantification and identification ions is characteristic and ranged from 2 to 3). **Table 59** summarizes the obtained results. In **Figure 121**, a chromatogram of a standard containing 2 mg/L of each PAH derivative and the IS is shown. Each compound provided a different response in the system as in the GC-MS/MS method, but in the latter this difference was even greater. However, in GC-MS the time was significantly reduced. As it can be seen O and OH2 were not completely separated (these compounds can be considered as two tautomers).

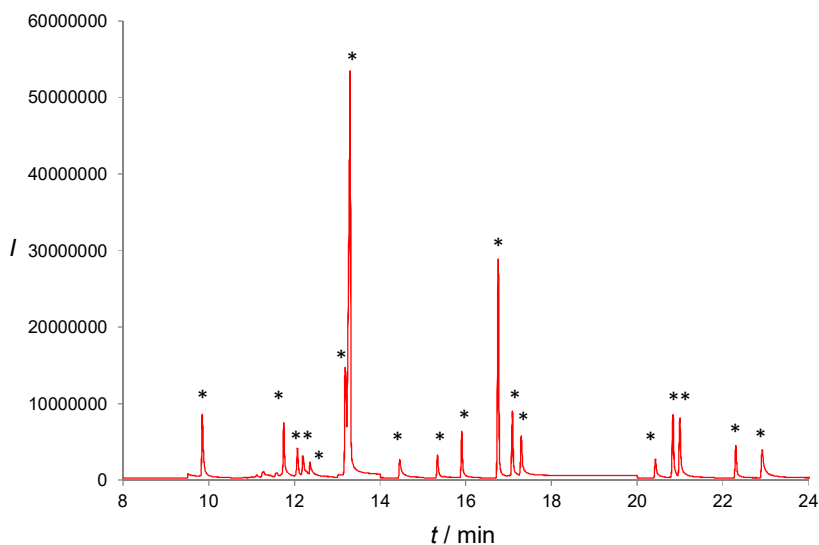


Figure 121. Chromatogram obtained for the 17 PAH derivatives and the IS (2 mg/L of each one, marked with *) in GC-MS (EI).

Table 59. GC-MS (EI) optimization.

Compound	t _r (min)	Quantification	Identification
		Ions (m/z)	
A	9.9	157	115
N1	11.8	127	115
N2	12.1	139	187
N3	12.3	173	77
AN	12.4	174	128
O	13.2	180	63
OH2	13.4	181	153
OH3	14.5	196	168
N4	15.4	114	126
N5	16.0	152	199
IS	16.8	212	106
N6	17.2	176	223
N7	17.4	114	172
N8	20.5	247	200
N9	20.9	201	247
N10	21.1	201	247
N11	22.4	226	215
N12	23.0	226	215

As for the GC-MS (CI) method, the same process of optimization was repeated (OH1 was not analyzed). For finding the t_r and the m/z of the quantification ion, PCI was chosen as ionization mode. Moreover, there was one additional parameter that had to be optimized:

the polarity of the CI. Thus, the previous step was performed again, but this time using NCI. The chromatograms in PCI and NCI modes for the 18 compounds (including the IS, concentrations of 0.4 mg/L for each compound) are shown in **Figure 122**. Mixed polarity chromatograms can be obtained in this system. Therefore, polarity was changed in order to obtain the highest response for each analyte according to the previous results. This time, the two tautomers were not separated at all, consequently they were analyzed together (i.e. as a sum of two compounds).

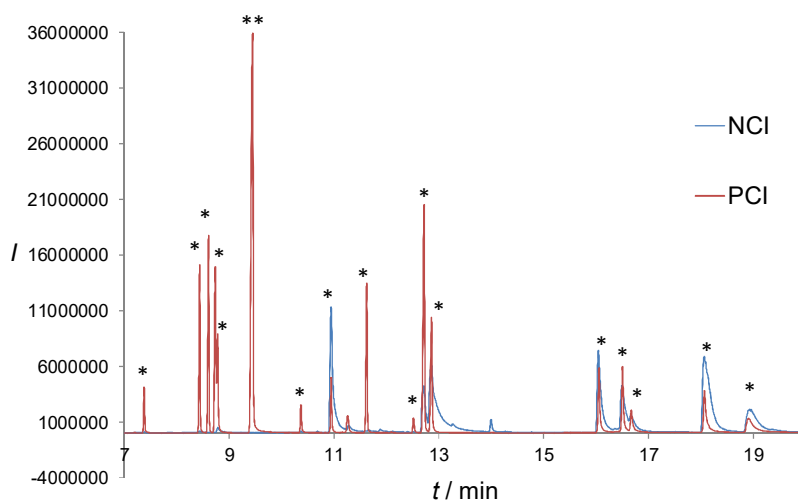


Figure 122. Chromatograms obtained for the 17 PAH derivatives and the IS (0.4 mg/L of each one, marked with *) in GC-MS: (blue line) NCI and (red line) PCI.

The results of the optimization process can be found in **Table 60**. Most of the PAH derivatives gave higher responses when PCI mode was used. In the literature, NCI was suggested for analyzing these compounds, but specifically NPAHs [237] which have functional groups that are good electron acceptors. The derivatives that moved through the system faster, including some NPAHs, had better responses in PCI. On the other hand, the NPAHs which were more retained had larger peak areas, although wider signals were observed. Also, PCI was better suited to analyze OPAHs, OHPAHs and AZAs. Finally, the analysis time was shorter compared to GC-MS (EI) and GC-MS/MS (EI).

Table 60. GC-MS (CI) optimization.

Compound	t _r (min)	Quantification	Identification	CI
		Ions (m/z)		
A	7.4	158	186	PCI
N1	8.4	174	128	PCI
N2	8.6	142	187	PCI
N3	8.7	174	128	PCI
AN	8.8	145	175	PCI
O	9.4 ^a	181	153	PCI
OH2	9.4 ^b	180	165	PCI
OH3	10.4	197	225	PCI
N4	10.9	218	187	NCI
N5	11.6	170	200	PCI
IS	12.5	213	241	PCI
N6	12.7	224	207	PCI
N7	12.9	173	219	PCI
N8	16.0	246	217	NCI
N9	16.5	246	217	NCI
N10	16.7	246	231	NCI
N11	18.1	272	243	NCI
N12	18.9	272	247	NCI

^a9.41 min, ^b9.43 min.

11.4 Comparison of the 3 developed methodologies

Some analytical parameters were calculated for establishing a comparison of the 3 GC methods presented in this Thesis. Calibration curves ($n=5$) were obtained for each PAH derivative (for the tautomers, only one curve was represented) in the 3 cases (the analytical signal was the ratio between the peak areas of each analyte and the IS). Linearity was excellent ($R^2 > 0.99$ for all compounds). Precision (evaluated intraday, $n=5$) was adequate as the average RSD for GC-MS/MS (EI), GC-MS (EI) and GC-MS (CI) were 9.6, 7.1 and 7.5% respectively. Sensitivity was an issue as standards with concentrations below 0.1 mg/L were hard to quantify. The explanation for this behavior can be that the injection system must temperature-controlled (using, for example, a programmed temperature vaporizing (PTV) injector). Thus, no LODs (and LOQs) were estimated. The 3 methods were compared in terms of the slopes of the calibration curves and **Figure 123** shows the results (OH1 was not considered).

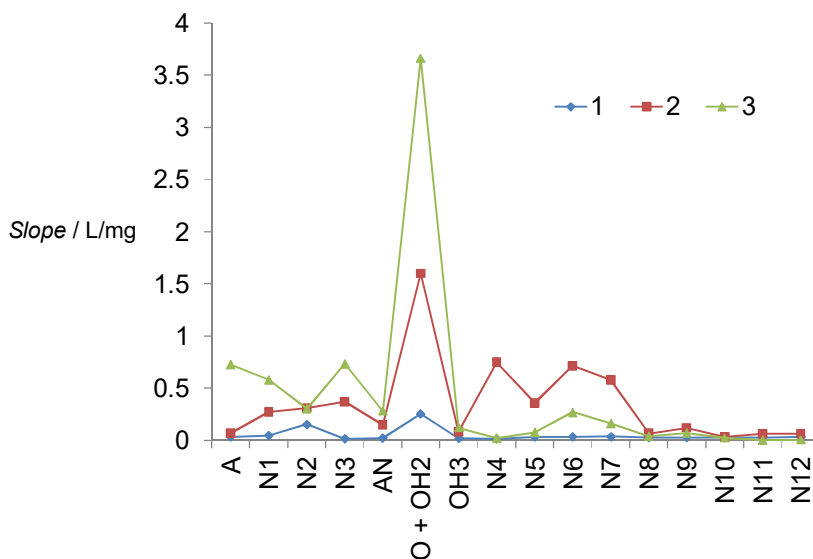


Figure 123. Comparison of the 3 proposed methods in terms of sensitivity (i.e. slope values). (1) GC-MS (EI), (2) GC-MS (CI) and (3) GC-MS/MS (EI).

GC-MS/MS (EI) had better sensitivity than GC-MS (EI) for most of the derivatives (for N10, N11 and N12, sensitivity was the lowest). However, GC-MS (CI) (which also has

better sensitivity than GC-MS (EI) for all compounds) was the best for analyzing the less volatile derivatives (with higher molecular masses) that moved slower through the system (all of them NPAHs as in [237]). Depending on the nature of the target analytes, GC-MS/MS (EI) or GC-MS (CI) can be selected. Notwithstanding, the best overall results (analysis time and intermediate sensitivities for all the compounds) were provided by GC-MS (CI).

11.5 Conclusions

GC coupled to MS detection was used for the study of PAHs and their derivatives. In the case of PAHs, a GC-MS method was developed for the quantification of these OCs. PLE was used as the extraction technique for analyzing air samples. Good results were achieved in terms of linearity, precision and accuracy. Compared to the method developed in Chapter 10, sensitivity, LODs and LOQs were not as good as the ones obtained for the UAE-IT-SPME-HPLC-FLD methodology. However, these parameters were adequate for performing the complete study.

The PAH derivatives, which can be considered as ECs (due to the lack of regulation of these compounds), were analyzed by 3 approaches: GC-MS (EI), GC-MS (CI) and GC-MS/MS (EI). After the proper optimization, the 3 methods were compared in terms of several figures of merit. Linearity and precision were good for all of them. However, sensitivity was not as good, probably due to the system injection. The best overall results were achieved by GC-MS (CI). This GC-MS (CI) methodology allowed one to change the polarity (PCI or NCI) during the chromatographic run. Depending on the situation, GC-MS/MS (EI) could also be used despite problems in quantifying the less volatile derivatives. More promising results can be expected in the near future considering that these methodologies can still be perfected.

Chapter 12.

Conclusions

From Chapter 4 to 11 of this Thesis, each one involving the study of a particular target compound (or family of compounds) in a given environmental matrix, specific conclusions (according to the obtained results) were given in the corresponding last section. Most of these compounds were ECs or related-contaminants for which methods of characterization and monitoring (i.e. the development and optimization of analytical methodologies for identifying or quantifying them in a given matrix) are highly required as their toxicity and environmental impact are not completely understood yet. IT-SPME coupled to LC in different configurations (some of them innovative in the field of scientific research) was the main technique used throughout the entire study. For the purpose of better outlining the achievements of this Thesis, a discussion analyte by analyte is given below.

Diclofenac

This pharmaceutical product, considered an emblematic EC, was selected as target compound in the development of an IT-SPME-nano-LC-DAD method for the analysis of water. The method presented a new configuration involving a capillary system of injection coupled to nanochromatography. Two valves, two pumps and one capillary column were required to accomplish this coupling. In addition, the chosen adsorbent for IT-SPME consisted of a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ -based nanomaterial which enhanced the efficiency extraction of the analyte allowing for the trace analysis. In other words, an innovative methodology has been established and it has the potential to become a useful tool to analyze not only diclofenac, but also other PCPPs and presumably ECs of different families.

Pesticides

These compounds are considered to be ECs, although many of them have been studied for a long time. Four of the five analyzed pesticides in this Thesis are classified as priority contaminants. However, their derivatives or other members of this group are not. Here, a Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD methodology has been developed taking advantage of the superparamagnetic properties of the nanomaterial used as adsorbent in the IT-SPME. The extraction efficiency of the compounds was increased by two factors: on the one hand the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ -based nanomaterial had better adsorption properties than non-functionalized adsorbents and on the other hand the applied external magnetic field promoted a higher retention of the diamagnetic analytes. Thus, trace analysis in water can be performed and as in the case of diclofenac, the procedure can potentially be extended to other ECs.

NPs

Nanomaterials are one of the most recent groups of ECs. Among them and due to their massive production, AgNPs were selected for different studies by multiple techniques. Three methods have been developed: a colorimetric method for the characterization of the

yield percentage of different AgNP syntheses and two others involving Cap-LC-DAD that can also be used for characterization as well as for quantification purposes. Signals in Cap-LC and IT-SPME-Cap-LC respond to spherical AgNP concentrations and, unlike the vast majority of the methods which use MS detection (i.e. quantify the Ag content), direct measures of the variations of SPRB (characteristic for a metallic NP) are made. On the other hand, the involved mechanisms have been completely explained through different experiments.

Aside from quantification, these versatile methods allow one to study size variation, polarity changes, hydrodynamic diameter variations, stability and functionality properties in aqueous matrices. Even more, IT-SPME-Cap-LC can be used to characterize the AgNP retention in complex matrices such as soils in a procedure involving the addition of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. These analytical tools are highly innovative and can be used to study other spherical NPs (e.g. AuNPs) and potentially non-spherical particles.

Surfactants

Despite the lack of a complete study in this Thesis, surfactants (also recent ECs like the nanomaterials) were analyzed as an application of the proposed Cap-LC methods for characterizing AgNPs. It was proven that a reported methodology for quantifying cationic surfactants through the hydrophobic effect on AgNPs could be improved, as the stability of NPs (necessary for performing this quantification) can be confirmed by the Cap-LC methods. In addition, IT-SPME-Cap-LC-DAD responds to variations of the hydrodynamic diameter (the NP property that changes through the hydrophobic effect, produced by the presence of surfactants on AgNPs), therefore this method can be used for detecting cationic surfactants (e.g. CTAB and BZKC) in aqueous matrices.

PAHs and derivatives

PAHs have been studied for a long time and most of them are regulated (mainly in water). Here, two methodologies have been used to analyze them in marine sediments allowing for the determination of their concentration at ng/g levels. The first method (MSPD-IT-SPME-HPLC-FLD) was an improvement of a methodology used for estimating PAHs in biota: a prior washing protocol of MSPD adsorbents based on UAE using different organic solvents was successfully applied, removing the adsorbent impurities that could interfere in PAH detection. The second one (UAE-IT-SPME-HPLC-FLD) was fully developed and compared to the ones reported in the literature. It reduces significantly sample handling, as well as the consumption of reagents and materials. These methods could be extended to other less-known PAHs or related compounds.

For comparison, a GC-MS (EI) method was optimized and successfully applied to the analysis of PAHs in air samples. In addition, this methodology was extended to study PAH derivatives (AZAs, OPAHs, OHPAHs and NPAHs), which can be considered as ECs. The MS conditions and system were changed resulting in the creation of two additional approaches (i.e. GC-MS (CI) and GC-MS/MS (EI)). The GC-MS with CI as ionization mode provided the best overall results. Considering that it can still be perfected and that there exists a lack of analytical methods for estimating PAH derivatives, more promising results can be foreseen.

Bibliografía

- [1] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) acerca de los contaminantes emergentes tales como éteres de difenilo polibromados (PBDEs) y bifenilos polibromados (PBBs), 2008.
- [2] Secretaría de la Convención de Estocolmo. Convención sobre contaminantes orgánicos persistentes (POPs), 2010.
- [3] Petrovic, M., González, S., Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 685–696.
- [4] Haigh, S. D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Science of the Total Environment*, 185, 161–170.
- [5] Balducci, C., Perilli, M., Romagnoli, P., Cecinato, A. (2012). New developments on emerging organic pollutants in the atmosphere. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1875–1884.
- [6] Pereira, L. C., de Souza, A. O., Franco-Bernardes, M. F., Pazin, M., Tasso, M. J., Pereira, P. H., Dorta, D. J. (2015). A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 13800–13823.
- [7] Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety (IPCS).
- [8] Zhang, Y., Guo, G. L., Han, X., Zhu, C., Kilfoy, B. A., Zhu, Y., Boyle, P., Zheng, T. (2008). Do polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) increase the risk of thyroid cancer? *Bioscience Hypotheses*, 1, 195–199.
- [9] Streit, B. (1998). Bioaccumulation of contaminants in fish. *Fish Ecotoxicology*, 86, 353–387.
- [10] Barón, E., Máñez, M., Andreu, A. C., Sergio, F., Hiraldo, F., Eljarrat, E., Barceló, D. (2014). Bioaccumulation and biomagnification of emerging and classical flame retardants in bird eggs of 14 species from Doñana Natural Space and surrounding areas (south-western Spain). *Environment International*, 68, 118–126.
- [11] Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B. (2014). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3–27.

- [12] Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de diciembre de 2006, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro.
- [13] Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, acerca de las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política del agua.
- [14] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). Lista de 126 contaminantes prioritarios (1981).
- [15] De Laender, F., Hammer, J., Hendriks, A. J., Soetaert, K., Janssen, C. R. (2011). Combining monitoring data and modeling identifies PAHs as emerging contaminants in the Arctic. *Environmental Science and Technology*, 45, 9024–9029.
- [16] de Oliveira, G. A. R., Lapuente, J., Leme, D. M., Ferraz, E. R. A., Meireles, G., de Oliveira, D. P. (2013). New paradigms for the environmental assessment in ecotoxicological and genetic approach. *Advances in environmental research*, 28. Nova Publishers, New York.
- [17] Barceló, D., López de Alda, M. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas.
- [18] Bound, J. P., Voulvoulis, N. (2004). Pharmaceuticals in the aquatic environment – a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere*, 56, 1143–1155.
- [19] Ruppert, G., Bauer, R., Heisler. (1993). The photo-Fenton reaction – an effective photochemical wastewater treatment process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73, 75–78.
- [20] Postigo, C., Sirtori, C., Oller, I., Malato, S., Maldonado, M. I., López de Alda, M., Barceló, D. (2011). Photolytic and photocatalytic transformation of methadone in aqueous solutions under solar irradiation: kinetics, characterization of major intermediate products and toxicity evaluation. *Water Research*, 45, 4815–4826.
- [21] Ternes, T. A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H. J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N. (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology*, 36, 3855–3863
- [22] Ternes, T. A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. (2003). Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater. *Water Research*, 37, 1976–1982.

- [23] Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1365–1377.
- [24] Shala, L., Foster, G.D. (2010). Surface water concentrations and loading budgets of pharmaceuticals and other domestic-use chemicals in an urban watershed (Washington, DC, USA). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 551–561.
- [25] Sorensen, J. P. R., Lapworth, D. J., Nkhuwa, D. C. W., Stuart, M. E., Goody, D. C., Bell, R. A., Chirwa, M., Kabika, J., Liemisa, M., Chibesa, M., Pedley, S. (2015). Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. *Water Research*, 72, 51–63.
- [26] Directiva del Consejo 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- [27] 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.
- [28] Directiva 2009/90/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de julio de 2009, relativa a las especificaciones técnicas de análisis químico y de seguimiento del estado de las aguas.
- [29] Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- [30] Smol, J. P. (2008). *Pollution of lakes and rivers: a paleoenvironmental perspective*. Blackwell Publishing, 2nd Edition, Oxford.
- [31] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) acerca de herramientas para la evaluación de exposición por una aproximación de estimación indirecta (evaluación de escenarios).
- [32] Carrera, J. (2006). *Transporte de solutos*. Jornadas sobre geotecnia medioambiental, Sevilla.
- [33] Thibodeau, L. J. (1996). *Environmental Chemodynamics* (2nd Edition). Ed John Wiley and Sons, New York.
- [34] Cheruiyot, D. J., Boyd, R. S., Coudron, T. A., Cobine, P. A. (2013). Biotransfer, bioaccumulation and effects of herbivore dietary Co, Cu, Ni, and Zn on growth and

development of the insect predator *Podisus maculiventris* (say). *Journal of Chemical Ecology*, 39, 764–772.

[35] Agencia Ambiental Europea (EEA). (2014). Air quality in Europe.

[36] Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Burden of disease from air pollution.

[37] Monzón, A., Guerrero, M. J. (2004). Valuation of social and health effects of transport-related air pollution in Madrid (Spain). *Science of the Total Environment*, 334–335, 427–434.

[38] Semazzi, F. (2003). Air quality research: perspective from climate change modelling research. *Environment International*, 29, 253–261.

[39] Kelly, F. J., Fussell, J. C. (2015). Air pollution and public health: emerging hazards and improved understanding of risk. *Environmental Geochemistry Health*, 37, 631–649.

[40] Oxley, T., ApSimon, H. M., de Nazelle, A. (2015). Investigating the sensitivity of health benefits to focussed PM_{2.5} emission abatement strategies. *Environmental Modelling and Software*, 74, 268–283

[41] Godschalk, R. W. L., Verhofstad, N., Verheijen, M., Yauk C. L., Linschooten, J. O., van Steeg, H., van Oostrom, C. T., van Benthem, J., van Schooten F. J. (2015). Effects of benzo[a]pyrene on mouse germ cells: heritable DNA mutation, testicular cell hypomethylation and their interaction with nucleotide excision repair. *Toxicology Research*, 4, 718-724.

[42] Zalel, A., Yuval, Svecova, V., Sram, R. J., Bartonova, A., Broday, D. M. (2015). Modeling airborne benzo(a)pyrene concentrations in the Czech Republic. *Atmospheric Environment*, 101, 166–176.

[43] Diario Oficial de la Unión Europea. (2008). L24, 51.

[44] Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K. Y. H. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International*, 71, 46–62.

[45] Bhatta, B. (2010). Analysis of urban growth and sprawl from remote sensing data. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg.

- [46] Houtman, C. J. (2010). Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences*, 7, 271-295.
- [47] Comisión Europea, acerca de la DMA “water is life: water framework directive”, 2002.
- [48] Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408, 6062-6069.
- [49] Dougherty, J. A., Swarzenski, P. W., Dinicola, R. S., Reinhard, M. (2010). Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Environmental Quality*, 39, 1173–1180.
- [50] Lin, A. Y. C., Yu, T. H., Lin, C. F. (2008). Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*, 74, 131–141.
- [51] Stuart, M., Lapworth, D. (2013). *Emerging organic contaminants in groundwater*. Ed. Springer, New York.
- [52] Domenech, X. (2008). *Química de la Hidrosfera. Origen y destino de los contaminantes*. Miraguano Ediciones, Madrid.
- [53] Choi, K., Kim, Y., Park, J., Park, C. K., Kim, M. Y., Kim, H. S., Kim, P. (2008). Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of the Total Environment*, 405, 120–128.
- [54] Petrovic, M., Skrbic, B., Zivancev, J., Ferrando-Climent, L., Barceló, D. (2014). Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. *Science of the Total Environment*, 468–469, 415–428.
- [55] Holt, E. A., Miller, S. W. (2011). Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*, 2, 8.
- [56] Gust, M., Gagné, F., Berlioz-Barbier, A., Besse, J. P., Buronfosse, T., Tournier, M., Tutundjian, R., Garric, J., Cren-Olivé, C. (2014). Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (gray) as an integrated field biomonitoring tool: exposure assessment and reprotoxic effects of water column contamination. *Water Research*, 54, 222–236.

- [57] Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2012). Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 2611–2624.
- [58] Nyberg, E., Faxneld, S., Danielsson, S., Eriksson, U., Miller, A., Bignert, A. (2015). Temporal and spatial trends of PCBs, DDTs, HCHs, and HCB in Swedish marine biota 1969–2012. *Ambio*, 44, 484–497.
- [59] Aelion, C. M. (2004). Soil contamination monitoring. *Environmental monitoring, Encyclopedia of life support systems (EOLSS)*, EOLSS Publishers, Oxford.
- [60] Li, J., Ye, Q., Gan, J. (2015). Influence of organic amendment on fate of acetaminophen and sulfamethoxazole in soil. *Environmental Pollution*, 206, 543–550.
- [61] Kinney, C. A., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Burkhardt, M. R., Werner, S. L., Cahill, J. D., Jorgensen, G. R. (2006). Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environmental Science and Technology*, 40, 7207–7215.
- [62] Choi, H. G., Moon, H. B., Choi, M., Yu, J. (2011). Monitoring of organic contaminants in sediments from the Korean coast: Spatial distribution and temporal trends (2001–2007). *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1352–1361.
- [63] Liu, C., Shao, S., Shen, Q., Fan, C., Zhou, Q., Yin, H., Xu, F. (2015). Use of multi-objective dredging for remediation of contaminated sediments: a case study of a typical heavily polluted confluence area in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17839–17849.
- [64] Bigus, P., Tobiszewski, M., Namiesnik, J. (2014). Historical records of organic pollutants in sediment cores. *Marine Pollution Bulletin*, 78, 26–42.
- [65] Aufartova, J., Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Novakova, L., Solich, P. (2011). Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using Green microextraction techniques: an overview. *Analytica Chimica Acta*, 704, 33–46.
- [66] Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.
- [67] Eisert, R., Pawliszyn, J. (1997). Automated in-tube solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 69, 3140–3147.

- [68] Kataoka, H., Narimatsu, S., Lord, H. L., Pawliszyn, J. (1999). Automated in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the determination of β -blockers and metabolites in urine and serum samples. *Analytical Chemistry*, 71, 4237–4244.
- [69] Saito, Y., Jinno, K. (2003). Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations. *Journal of Chromatography A*, 1000, 53–67.
- [70] Wu, J. C., Pawliszyn, J. (2001). Polypyrrole coated capillary coupled to HPLC for in-tube solid phase microextraction and analysis of aromatic compounds in aqueous samples. *Analytical Chemistry*, 73, 55–63.
- [71] Moliner-Martínez, Y., Prima-García, H., Ribera, A., Coronado, E., Campins-Falcó, P. (2012). Magnetic in-tube solid phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 84, 7233–7240.
- [72] Kataoka, H., Ishizaki, A., Nonaka, Y., Saito, K. (2009). Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. *Analytica Chimica Acta*, 655, 8–29.
- [73] Campins-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, A., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R. (2008). New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211, 13–21.
- [74] Prieto-Blanco, M. C., López-Mahía, P., Campins-Falcó, P. (2009). In-tube solid-phase microextraction and liquid chromatography using monolithic column for the selective determination of residual ethylenediamine in industrial cationic polymers. *Analytical Chemistry*, 81, 5827–5832.
- [75] Campins-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Cháfer-Pélicas, C. (2009). On-line determination of aliphatic amines in water using in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatisation in in-valve mode for processing large simple volumes in LC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 557–565.
- [76] Wu, J. C., Xie, W., Pawliszyn, J. (2000). Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC-ES-MS for the determination of catechins and caffeine in tea. *Analyst*, 125, 2216–2222.
- [77] Gou, Y. N., Pawliszyn, J. (2000). In-tube solid-phase microextraction coupled to capillary LC for carbamate analysis in water samples. *Analytical Chemistry*, 81, 5827–5832.

- [78] Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P. (2015). Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 205–213.
- [79] Campins-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, A., Herráez-Hernández, R., Molins-Legua, C., Moliner-Martínez, Y. (2010). In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2695–2702.
- [80] Dittrich, P. S., Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 210–218.
- [81] Campins-Falcó, P., Coronado, E., Moliner-Martínez, Y., Ribera, A., Prima-García, H. (2014). Dispositivo y método de microextracción en fase sólida en tubo magnética. Patente ES2401883B1, fecha de concesión 18 febrero de 2014, España.
- [82] Moliner-Martínez, Y., Ribera, A., Coronado, E., Campins-Falcó, P. (2011). Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2276–2283.
- [83] Bagheri, H., Afkahi, A., Saber-Tehrani, M., Khoshshafar, H., (2012). Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 97, 87–95.
- [84] Bianchi, F., Chiesi, V., Casoli, F., Luches, P., Nasi, L., Careri, M., Mangia, A. (2012). Magnetic solid-phase extraction based on diphenyl functionalization of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples. *Journal of Chromatography A*, 1231, 8–15.
- [85] Madrakina, T., Afkhami, A., Mahmoo-Kashani, H., Ahmadi, M. (2013). Superparamagnetic surface molecularly imprinted nanoparticles for sensitive solid-phase extraction of tramadol from urine samples. *Talanta*, 105, 255–261.
- [86] Wang, Q., Huang, L., Yu, P., Wang, J., Shen, S. (2013). Magnetic solid-phase extraction and determination of puerarin in rat plasma using C18-functionalized magnetic silica nanoparticles by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 912, 33–37.

- [87] Eskandari, H., Naderi-Darehshori, A. (2012). Preparation of magnetite/poly(styrene-divinylbenzene) nanoparticles for selective enrichment-determination of fenitrothion in environmental and biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 743, 137–144.
- [88] Beiraghi, A., Pourghazi, K., Amoli-Diva, M., Razmara, A. (2014). Magnetic solid-phase extraction of mefanamic acid from biological samples based on the formation of mixed hemicelles aggregates on Fe_3O_4 nanoparticles to its HPLC-UV detection. *Journal of Chromatography B*, 945–946, 46–52.
- [89] Globig, D., Weickarhardt, C. (2005). Fully automated in-tube solid-phase microextraction for liquid samples coupled to gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 656–659.
- [90] Cháfer-Pericás, C., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P. (2006). On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1125, 159–171.
- [91] Prieto-Blanco, M. C., Cháfer-Pericás, C., López-Mahía, P., Campins-Falcó, P. (2008). Automated on-line in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatization coupled to liquid chromatography for quantifying residual dimethylamine in cationic polymers. *Journal of Chromatography A*, 1188, 118–123.
- [92] Moliner-Martínez, Y., Serra-Mora, P., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P. (2015). Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 1485–1497.
- [93] Jornet-Martínez, N., Serra-Mora, P., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P. (2015). Evaluation of carbon nanotubes functionalized polydimethylsiloxane based coatings for In-Tube Solid Phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Chromatography*, 2, 515–528.

- [94] Ruhoy, I. S., Daughton, C. G. (2008). Beyond the medicine cabinet: An analysis of where and why medications accumulate. *Environment International*, 34, 1157–1169.
- [95] Jelic, A., Gros, M., Petrovic, M., Ginebreda, A., Barceló, D. (2012). Occurrence and elimination of pharmaceuticals during conventional wastewater treatment. *Handbook of Environmental Chemistry*, 19, 1–24.
- [96] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). 2009. Lista de contaminantes candidatos para ser prioritarios en aguas de beber (CCL-3).
- [97] Decisión de ejecución 2015/495/UE de la Comisión, de 20 de marzo de 2015, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.
- [98] Jones, O. A., Voulvoulis, N., Lester, J. N. (2001). Human pharmaceuticals in the aquatic environment — a review. *Environmental Toxicology*, 22, 1383–1394.
- [99] Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, 1319–1330.
- [100] Crouse, B. A., Ghoshdastidar, A. J., Tong, A. Z. (2012). The presence of acidic and neutral drugs in treated sewage effluents and receiving waters in the Cornwallis and Annapolis River watersheds and the Mill Cove Sewage Treatment Plant in Nova Scotia, Canada. *Environmental Research*, 112, 92–99.
- [101] Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J. M., Ternes, T. (2008). Determination of the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research*, 42, 287–295.
- [102] Beltrán, J., Hernández, F., Morell, I. (1995). Estudios de adsorción de plaguicidas en suelos mediante experiencias en batch. *Avances en la investigación en la zona no saturada*. Ed. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Vitoria.
- [103] Xie, Z., Lu, G., Liu, J., Yan, Z., Ma, B., Zhang, Z., Chen, W. (2015). Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China. *Chemosphere*, 138, 140–147.
- [104] Chitescu, C. L., Kaklamanos, G., Nicolau, A. I., Stolker, A. A. (2015). High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. *Science of the Total Environment*, 532, 501–511.

- [105] Silva, A. R. M., Portugal, F. C. M., Nogueira, J. M. F. (2008). Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices. Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases. *Journal of Chromatography A*, 1209, 10-16.
- [106] Mehinto, A. C., Hill, E. M., Tyler, C. R. (2010). Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Technology*, 44, 2176–2182.
- [107] Kallio, J. M., Lahti, M., Oikari, A., Kronberg, L. (2010). Metabolites of the aquatic pollutant diclofenac in fish bile. *Environmental Science and Technology*, 44, 7213–7219.
- [108] Lahti, M., Brozinski, J. M., Jylha, A., Kronberg, L., Oikari, A. (2011). Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 1403–1411.
- [109] de Sousa, D. N., Grosseli, G. M., Mozeto, A. A., Carneiro, R. L., Fadini, P. S. (2015). Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments. *Journal of Separation Science*, 38, 3454–3460.
- [110] Martín, J., Santos J. L., Aparicio, I., Alonso, E. (2010). Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *Journal of Separation Science*, 33, 1760–1766.
- [111] Azzouz, A., Ballesteros, E. (2012). Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. *Science of the Total Environment*, 419, 208–215.
- [112] Xu, J., Wu, L., Chen, W., Chang, A. C. (2008). Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202, 189–195.
- [113] Pérez-Carrera, E., Hansen, M., León, V.M., Björklund, E., Krogh, K. A., Halling-Sørensen, B., González-Mazo, E. (2010). Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 1173–1184.
- [114] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) acerca de ¿qué son los pesticidas?, 2008.

- [115] Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., Trinsoutrot-Gattin, I. (2014). Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 257–273.
- [116] Bjørling-Poulsen, M., Andersen, H. R., Grandjean, P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*, 7, 50–72.
- [117] Mage, D. T., Allen, R. H., Gondy, G., Smith, W., Barr, D. B., Needham, L. L. (2004). Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatinine correction in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-III). *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 14, 457–465.
- [118] Velisek, J., Koutnik, D., Zuskova, E., Stara, A. (2016). Effects of the terbuthylazine metabolite terbuthylazine-desethyl on common carp embryos and larvae. *Science of the Total Environment*, 539, 214–220.
- [119] Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D. (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, 1216, 520–529.
- [120] Directiva del Consejo 75/440/CEE, de 16 de Junio de 1975, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros.
- [121] Directiva del Consejo 98/83/CE, de 3 de noviembre 1998, relativa a la calidad del agua destinada para el consumo humano.
- [122] Reglamento de ejecución (UE) número 820/2011 de la Comisión, de 16 de agosto de 2011, por el que se aprueba la sustancia activa terbutilazina de conformidad con el Reglamento (CE) número 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y que modifican el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) número 540/2011 de la Comisión y la Decisión 2008/934/CE de la Comisión.
- [123] Greene, S. A. (2005). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agriculture Chemicals*. Ed. William Andrew Publishing, New York.
- [124] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). (2009). Registro Federal 74, 17579–17585.
- [125] Regulación (CE) Número 396/2005 del Parlamento Europeo y el Consejo del 23 de febrero de 2005 en los niveles de residuos máximos de pesticidas en o sobre alimentos y

piensos de origen vegetal y animal y que modifica la directiva 91/414/CEE del Consejo (Diario Oficial L70/16.3.2005).

[126] Feng, X. L., Li, Y., Jing, R. J., Jiang, X. Y., Tian, M. K. (2014). Detection of organophosphorous pesticides in soil samples with multiwalled carbon nanotubes coating SPME fiber. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93, 769–774.

[127] Fernández-Álvarez, M., Llombart, M., Lamas, J. P., Lores, M., García-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T. (2008). Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1188, 154–163.

[128] Terzopoulou, E., Voutsas, D., Kaklamanos, G. (2015). A multi-residue method for determination of 70 organic micropollutants in surface waters by solid-phase extraction followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 1095–1112.

[129] Yang, Y. H., Kong, W. J., Zhao, L. H., Xiao, Q., Liu, H. M., Zhao, X. S., Yang, M. H. (2015). A multiresidue method for simultaneous determination of 44 organophosphorous pesticides in *Pogostemon cablin* and related products using modified QuEChERS sample preparation procedure and GC–FPD. *Journal of Chromatography B*, 974, 118–125.

[130] Alves, A. C., Gonçalves, M. M., Bernardo, M. M., Mendes, B. S. (2012). Dispersive liquid–liquid microextraction of organophosphorous pesticides using nonhalogenated solvents. *Journal of Separation Science*, 35, 2653–2658.

[131] Alves, A. C., Gonçalves, M. M., Bernardo, M. M., Mendes, B. S. (2011). Validated dispersive liquid-liquid microextraction for analysis of organophosphorous pesticides in water. *Journal of Separation Science*, 34, 1326–1332.

[132] Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani-Hosseini, M. R., Aghae, E. (2006). Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1123, 1–9.

[133] Gómez M. J., Martínez-Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba A. R., Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66, 993–1002.

[134] Rocha, A. A., Monteiro S. H., Andrade, G. C. R. M., Vilca, F. Z., Tornisielo, V. L. (2015). Monitoring of pesticide residues in surface and subsurface waters, sediments, and

fish in center-pivot irrigation areas. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26, 2269–2278.

[135] Rocha M. J., Ribeiro M. F. T., Cruzeiro, C., Figueiredo, F., Rocha, E. (2012). Development and validation of a GC-MS method for determination of 39 common pesticides in estuarine water—targeting hazardous amounts in the Douro River estuary. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92, 1587–1608.

[136] Chen, D. W., Zhang, Y. P., Miao, H., Zhao, Y. F., Wu, Y. N. (2015). Determination of triazine herbicides in drinking water by dispersive micro solid phase extraction with ultrahigh-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9855–9862.

[137] N. Rodríguez-González, N., González-Castro, M. J., Beceiro-González, E., Muniategui-Lorenzo, S. (2015). Development of a matrix solid phase dispersion methodology for the determination of triazine herbicides in mussels. *Food Chemistry*, 173, 391–396.

[138] Carafa, R., Wollgast, J., Canuti, E., J. Lighthart, J., S. Dueri, S., Hanke, G., Eisenreich S. J., Viaroli, P., Zaldívar, J. M. (2007). Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere*, 69, 1625–1637.

[139] Liang, M., Guo, L. H. (2009). Application of nanomaterials in environmental analysis and monitoring. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 2283–2289.

[140] Franchi, L. P., Manshian, B. B., de Souza, T. A., Soenen, S. J., Matsubara, E. Y., Rosolen, J. M., Takahashi, C. S. (2015). Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast. *Toxicology in Vitro*, 29, 1319–1331.

[141] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) acerca de herramientas para la evaluación de exposición por clase química (nanomateriales).

[142] Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, 17–71.

[143] Brown, D. M., Donaldson, K., Borm, P. J., Schins, R. P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L. A., Stone, V. (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286, 344–353.

- [144] Reglamento (UE) número 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.
- [145] Nowack, N., Krug, H. F., Height, M. 2011. 120 Years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science and Technology*, 45, 1177–1183.
- [146] Alarcón, E. I., Udekwu, K., Skog, M., Pacioni, N. L., Stamplecoskie, K. G., González-Béjar, M., Poliseti, N., Wickham, A., Richter-Dahlfors, A., Griffith, M., Scaiano, J. C. (2012). The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. *Biomaterials*, 33, 4947–4956.
- [147] Kumar, A., Vemula, P. K., Ajayan, P. M., John, G. (2008). Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials*, 7, 236–241.
- [148] Guzmán, K. A. D., Taylor, M. R., Banfield, J. F. (2006). Environmental risks of nanotechnology: National Nanotechnology Initiative funding, 2000–2004. *Environmental Science and Technology*, 40, 1401–1407
- [149] Varner, K. E., El-Badawy, A., Feldhake, D., Venkatapathy, R. (2010). State-Of-The-Science Review: everything nanosilver and more. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- [150] Srivastava, A., Mishra, V., Singh, P., Kumar, R. (2012). Coumarin-based polymer and its silver nanocomposite as advanced antibacterial agents: synthetic path, kinetics of polymerization, and applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 126, 395–407.
- [151] Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W., Sun, H., Tam, P. K. H., Chiu, J. F., Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, 527–534.
- [152] Kanmani, P., Rhim, J. W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148, 162–169.
- [153] Kumar, A., Vyas, G., Bhatt, M., Bhatt, S., Paul, P. (2015). Silver nanoparticle based highly selective and sensitive solvatochromatic sensor for colorimetric detection of 1,4-dioxane in aqueous media. *Chemical Communications*, 51, 15936–15939.
- [154] Li, S., Xiong, J. X., Shen, J. S., Qin, Y., Li, J., Chu F. Q., Kong, Y., Deng, L. H. (2015). A novel hydrogen peroxide sensor based on Ag nanoparticles decorated polyaniline/graphene composites. *Journal of Applied Polymer Science*, doi: 10.1002/APP.42409.

- [155] Borase, H. P., Patil, C. D., Salunkhe, R. B., Suryawanshi, R. K., Salunke, B. K., Patil, S. V. (2015). Biofunctionalized silver nanoparticles as a novel colorimetric probe for melamine detection in raw milk. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62, 652–662.
- [156] Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4, 3974–3983.
- [157] Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408, 999–1006.
- [158] Ai, L. H. Zeng, C. M., Wang, Q. M. (2011). One-step solvothermal synthesis of Ag-Fe₃O₄ composite as a magnetically recyclable catalyst for reduction of Rhodamine B. *Catalysis Communications*, 14, 68–73.
- [159] Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Yacaman, J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346–2353.
- [160] Pal, S., Tak Y. K., Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1712–1720.
- [161] Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Epple, M. (2010). Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials*, 22, 4548–4554.
- [162] Liu, J., Hurt, R. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science and Technology*, 44, 2169–2175.
- [163] Dobias, J., Bernier-Latmani, R. (2013). Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environmental Science and Technology*, 47, 4140–4146.
- [164] Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L., Álvarez, P. J. (2012). Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*, 12, 4271–4275.
- [165] Lee, K. J., Nallathamby, P. D., Browning, L. M., Osgood, C. J., Xu, X. H. N. (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 1, 133–143.

- [166] Lansdown, A. B. G. (2002). Silver 2: toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *Journal of Wound Care*, 11, 173–177.
- [167] Navarro, R., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, K., Sigg, L., Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*, 42, 8959–8964.
- [168] Judy, J. D., Unrine, J. M., Bertsch, P. M. (2011). Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental Science and Technology*, 45, 776–781.
- [169] Gogos, A., Knauer, K., Bucheli, T. D. (2012). Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9781–9792.
- [170] Ma, R., Levard, C., Judy, J. D., Unrine, J. M., Durenkamp, M., Martin, B., Jefferson, B., Lowry, G. V. (2014). Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant and in processed biosolids. *Environmental Science and Technology*, 48, 104–112.
- [171] Pan, B., Xing, B. (2012). Applications and implications of manufactured nanoparticles in soils: a review. *European Journal of Soil Science*, 63, 437–456.
- [172] VandeVoort, A. R., Arai, Y. (2012). Environmental chemistry of silver in soils: current and historic perspective. *Advances in Agronomy*, 114, 59–90.
- [173] Tang, B., Xu, S., Hou, X., Li, J., Sun, L., Xu, W., Wang, X. (2013). Shape evolution of silver nanoplates through heating and photoinduction. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5, 646–653.
- [174] Willets, K. A., Van Duyne, R. P. (2006). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58, 267–297.
- [175] Stewart, M. E., Anderton, C. R., Thompson, L. B., Maria, J., Gray, S. K., Rogers, J. A., Nuzzo, R. G. (2008). Nanostructured plasmonic sensors. *Chemical Reviews*, 108, 494–521.
- [176] Zhao, L. L., Kelly, K. L., Schatz, G. C. (2003). The extinction spectra of silver nanoparticle arrays: influence of array structure on plasmon resonance wavelength and width. *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 7343–7350.

- [177] Liu, J. F., Jian, G. B. (2015). Silver nanoparticles in the environment. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg.
- [178] Jornet-Martínez, N., González-Béjar, M., Moliner-Martínez, Y., Campins-Falcó, P., Julia Pérez-Prieto, J. (2014). Sensitive and selective plasmonic assay for spermine as biomarker in human urine. *Analytical Chemistry*, 86, 1347–1351.
- [179] Lin, J. H., Tseng, W. L. (2012). Gold nanoparticles for specific extraction of biomolecules and environmental pollutants. *Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 153–162.
- [180] Pompa, P. P., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Sabella, S., Maiorano, G., Falqui, A., Bertoni, G., Cingolani, R. (2011). In vivo toxicity assessment of gold nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Nano Research*, 4, 405–413.
- [181] Noël, C., Simard J. C., Girard, D. (2016). Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicology in Vitro*, 31, 12–22.
- [182] Hassellöv, M., Lyvén, B., Haraldsson, C., Sirinawin, W. (1999). Determination of continuous size and trace element distribution of colloidal material in natural water by on-line coupling of flow field-flow fractionation with ICPMS. *Analytical Chemistry*, 71, 3497–3502.
- [183] Novak, J. P., Nickerson, C., Franzen, S., Feldheim, D. L. (2001). Purification of molecularly bridged metal nanoparticle arrays by centrifugation and size exclusion chromatography. *Analytical Chemistry*, 73, 5758–5761.
- [184] Al-Somali, A. M., Krueger, K. M., Falkner, J. C., Colvin, V. L. (2004). Recycling size exclusion chromatography for the analysis and separation of nanocrystalline gold. *Analytical Chemistry*, 76, 5903–5910.
- [185] Liu, F. K., Ko, F. H., Huang, P. W., Wu, C. H., Chu, T. C. (2005). Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1062, 139–145.
- [186] Lo, C. K., Paau, M. C., Xiao, D., Choi, M. M. (2008). Capillary electrophoresis, mass spectrometry, and UV-visible absorption studies on electrolyte-induced fractionation of gold nanoclusters. *Analytical Chemistry*, 80, 2439–2446.
- [187] Chatterjee, A., Santra, M., Won, N., Kim, S., Kim, J. K., Kim, S. B., Ahn, K. H. (2009). Selective fluorogenic and chromogenic probe for detection of silver ions and silver

nanoparticles in aqueous media. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 2040–2041.

[188] Shen, C. W., Yu, T. (2009). Size-fractionation of silver nanoparticles using ion-pair extraction in a counter-current chromatograph. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5962–5967.

[189] Pacioni, N. L., González-Béjar, M., Alarcón, E., McGilvray, K. L., Scaiano, J. C. (2010). Surface plasmons control the dynamics of excited triplet states in the presence of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 6298–6299.

[190] Ulrich, A., Losert, S., Bendixen, N., Al-Kattan, A., Hagedorfer, H., Nowack, B., Adlhart, C., Ebert, J., Lattuada, M., Hungerbühler, K. (2012) Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 1131–1142.

[191] Liu, J. F., Chao, J. B., Liu, R., Tan, Z. Q., Yin, Y. G., Wu, Y., Jiang, G. B. (2009). Cloud point extraction as an advantageous preconcentration approach for analysis of trace silver nanoparticles in environmental waters. *Analytical Chemistry*, 81, 6496–6502.

[192] Tiede, K., Boxall, A. B. A., Tiede, D., Tear, S. P., David, H., Lewis, J. (2009). A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in ‘real’ environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24, 964–972.

[193] Chao, J. B., Liu, J. F., Yu, S. J., Feng, Y. D., Tan, Z. Q., Liu, R., Yin, Y. G. (2011). Speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in antibacterial products and environmental waters via cloud point extraction-based separation. *Analytical Chemistry*, 83, 6875–6882.

[194] Laborda, F., Jiménez-Lamana, J., Bolea, E., Castillo, J. R. (2011). Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26, 1362–1371.

[195] Poda, A. R., Bednar, A. J., Kennedy, A. J., Harmon, A., Hull, M., Mitrano, D. M., Ranville, J. F., Steevens, J. (2011). Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4219–4225.

- [196] Mitrano, D. M., Barber, A., Bednar, A., Westerhoff, P., Higgins, C. P., Ranville, J. F. (2012). Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 1131–1142.
- [197] Soto-Alvaredo, J., Montes-Bayón, M., Bettmer, J. (2013). Speciation of silver nanoparticles and silver(I) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICPMS. *Analytical Chemistry*, 85, 1316–1321.
- [198] Franze, B., Engelhard, C. (2014). Fast separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS. *Analytical Chemistry*, 86, 5713–5720.
- [199] Hanley, T. A., Saadawi, R., Zhang, P., Caruso, J. A., Landero-Figueroa, J. (2014). Separation of silver ions and starch modified silver nanoparticles using high performance liquid chromatography with ultraviolet and inductively coupled mass spectrometric detection. *Spectrochimica Acta Part B*, 100, 173–179.
- [200] Liu, L., He, B., Liu, Q., Yun, Z., Yan, X., Long, Y., Jiang, G. B. (2014). Identification and accurate size characterization of nanoparticles in complex media. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 14476–14479.
- [201] Zhou, X. X., Liu, R., Liu, J. F. (2014). Rapid chromatographic separation of dissoluble Ag(I) and silver containing nanoparticles of 1–100 nanometer in antibacterial products and environmental waters. *Environmental Science and Technology*, 48, 14516–14524.
- [202] Mudalige, T. K., Qu, H., Sánchez-Pomales, G., Sisco, P. N., Linder, S. W. (2015). Simple functionalization strategies for enhancing nanoparticle separation and recovery with asymmetric flow field flow fractionation. *Analytical Chemistry*, 87, 1764–1772.
- [203] Zheng, L. Q., Yu, X. D., Xu, J. J., Chen, H. Y. (2014). Rapid visual detection of quaternary ammonium surfactants using citrate-capped silver nanoparticles (Ag NPs) based on hydrophobic effect. *Talanta*, 118, 90–95.
- [204] Yan, S., Subramanian, S. B., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Zhang, T. C. (2010). Emerging contaminants of environmental concern: source, transport, fate, and treatment. *Practice Periodical of Hazardous Toxic and Radioactive Waste Management*, 14, 2–20.
- [205] Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32, 417–431.

- [206] Ivanković, T., Hrenović, J. (2010) Surfactants in the environment. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 61, 95–110.
- [207] Lorenzi, D., Entwistle, J. A., Cave, M., Dean, J. R. (2011). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban street dust: implications for human health. *Chemosphere*, 83, 970–977.
- [208] Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G., Meric, S. (2009). Determination of PAHs in marine sediments: analytical methods and environmental concerns. *Global Nest Journal*, 11, 391–405.
- [209] Mardberg, A. C. (2006). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on *Sphagnum* moss peat. Chalmers University of Technology, Göteborg.
- [210] Northcott, G. L., Jones, K. C. (2001). Partitioning, extractability and formation of non-extractable PAH residues in soil: I. Compound differences in aging and sequestration. *Environmental Science and Technology*, 35, 1103–1110.
- [211] Ministerio de Presidencia. (2005). Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *Boletín Oficial del Estado* 15/2005, 1833–1843.
- [212] Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) acerca de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), 2008, Washington DC.
- [213] Mercado-Calderón, F. (1997). *Hidrocarburos poliaromáticos*, Mexico DF.
- [214] Atkinson, R., Arey, J. (1994). Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. *Environmental Health Perspectives*, 102, 117–126.
- [215] Bleeker, E. A. J., Van Der Geest, H. G., Klamer, H. J. C., De Voogt, P., Wind, E., Kraak, M. H. S. (1999). Toxic and genotoxic effects of azaarenes: isomers and metabolites. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 13, 191–203.
- [216] Wei, C., Bandowe, B. A. M., Han, Y. M., Cao, J. J., Zhan, C. L., Wilcke, W. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (alkyl-PAHs, oxygenated-PAHs, nitrated-PAHs and azaarenes) in urban road dusts from Xi'an, Central China. *Chemosphere*, 134, 512–520.

- [217] Tsapakis, M., Stephanou, E.G. (2007). Diurnal cycle of PAHs, nitro-PAHs, and oxy-PAHs in a high oxidation capacity marine background atmosphere. *Environmental Science and Technology*, 41, 8011–8017.
- [218] Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons, Geneva.
- [219] Griest, W. H., Caton, J. E. (1983). Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. A. Bjorseth (Ed.), New York.
- [220] Pena, M. T., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R. (2007). Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1165, 32–38.
- [221] Pena M. T., Pensado, L., Casais, M. C., Mejuto M. C., Cela, R. (2007). Sample preparation of sewage sludge and soil samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on one-pot microwave-assisted saponification and extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2559–2567.
- [222] Fernández-González, V. Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. (2008). Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1196, 65–72.
- [223] González-Piñuela, C., Alonso-Salces, R. M., Andrés, A., Ortiz, I., Viguri, J. R. (2006). Validated analytical strategy for the determination of polycyclic aromatic compounds in marine sediments by liquid chromatography coupled to diode-array detection and mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1129, 189–200.
- [224] Burkhardt, M. R., Zaugg, S. D., Burbank, T. L., Olson, M. C., Iverson, J. L. (2005). Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and alkylated PAH homolog groups in sediment. *Analytica Chimica Acta*, 549, 104–116.
- [225] Choi, M., Kim, Y. J., Lee, I. S., Choi, H. G. (2014). Development of a one-step integrated pressurized liquid extraction and cleanup method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments. *Journal of Chromatography A*, 1340, 8–14.
- [226] Hosseini, M. H., Rezaee, M., Mashayekhi, H. A., Akbarian, S., Mizani, F., Pourjavid, M. R. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples using

flotation-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1265, 52–56.

[227] Yiantzi, E., Kalogerakis, N., Psillakis, E. (2015). Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples. *Analytica Chimica Acta*, 890, 108–116.

[228] Ghiasvand, A. R., Pirdadeh-Beiranvand, M. (2015). Cooling/heating-assisted headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Analytica Chimica Acta*, 900, 56–66.

[229] Wang, Y., Zhang, J., Ding, Y., Zhou, J., Ni, L., Sun, C. (2009). Quantitative determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples using solid-phase microextraction. *Journal of Separation Science*, 32, 3951–3957.

[230] Saleh, A., Yamini, Y., Faraji, M., Rezaee, M., Ghambarian, M. (2009). Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6673–6679.

[231] Cheng, J., Matsadiq, G., Liu, L., Zhou, Y. W., Chen, G. (2011). Development of a novel ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2476–2482.

[232] García-López, M., Canosa, P., Rodríguez, I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 963–974.

[233] Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H., Villenave, E. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the Marseilles area (south of France): concentrations and sources. *Science of the Total Environment*, 384, 280–292.

[234] Niederer, M. (1998). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and substitutes (nitro-, oxy-PAHs) in urban soil and airborne particulate by GC-MS and NCI-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 5, 209–216.

[235] Cochran, R. E., Dongari, N., Jeong, H., Beránek, J., Haddadi, S., Shipp, J., Kubátová, A. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products. *Analytica Chimica Acta*, 740, 93–103.

- [236] Fujiwara, F. G., Guiñez M. E., Cerutti, S., Smichowski, P. (2014). UHPLC-(+)APCI-MS/MS determination of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter and tree barks collected in Buenos Aires city. *Microchemical Journal*, 116, 118–124.
- [237] Dusek, B., Hajslová, J., Kocourek, V. (2002). Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and their precursors in biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, 982, 127–143.
- [238] Reglamento (CE) n° 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas.
- [239] Frank, A. J., Cathcart, N., Maly, K. E., Kitaev, V. (2010). Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: a first-year undergraduate experiment exploring plasmonic nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 87, 1098–1101.
- [240] Millstone, J. E., Hurst, S. J., Métreux, G. S., Cutler, J. I., Mirkin, C. A. (2009). Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *Small*, 5, 646–664.
- [241] Sun, S., Zeng, H. J. (2002). Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 8204–8205.
- [242] Hara, T., Kobayashi, H., Ikegami, T., Nakanishi, K., Tanaka, N. (2006). Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains. *Analytical Chemistry*, 78, 7632–7642.
- [243] Suárez, B., Simonet, B. M., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2007). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1159, 203–207.
- [244] Sombra, L., Moliner-Martínez, Y., Valcárcel, M. (2008). Carboxylic multi-walled carbon nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 29, 3850–3857.
- [245] Slentz, B. E., Penner, N. A., Lugowska, E., Regnier, F. (2001). Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane). *Electrophoresis*, 22, 3736–3743.
- [246] Park, I. S., Heo, E., Nam, Y. S., Lee, C. W., Kim, J. M. (2012). Colorimetric detection of aliphatic primary amines and a molecular logic gate based on a photochromic

phenoxyquinone derivative. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 238, 1–6.

[247] Stamplecoskie, K. G., Scaiano, J. C. (2010). Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 1825–1827.

[248] Steinigeweg, D., Schlücker, S. (2012). Monodispersity and size control in the synthesis of 20–100 nm quasi-spherical silver nanoparticles by citrate and ascorbic acid reduction in glycerol–water mixtures. *Chemical Communications*, 48, 8682–8684.

[249] Lee, P. C., Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86, 3391–3395.

[250] Wan, Y., Guo, Z., Jiang, X., Fang, K., Lu, X., Zhang, Y., Gu, N. (2013). Quasi-spherical silver nanoparticles: aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 394, 263–268.

[251] Pyrzynska, K. (2013). Use of nanomaterials in sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 43, 100–108.

[252] D’Orazio, G., Fanali, S. (2013). Combination of two different stationary phases for on-line pre-concentration and separation of basic drugs by using nano-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1285, 118–123.

[253] Xu, J., Zheng, J., Tian, J., Zhu, F., Zeng, F., Su, C., Ouyang, G. (2013). New materials in solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 47, 68–83.

[254] Mullet, W. M., Martín, P., Pawliszyn, J. (2001). In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. *Analytical Chemistry*, 73, 2383–2389.

[255] Wu, J., Tragas, C., Lord, H., Pawliszyn, J. (2002). Analysis of polar pesticides in water and wine samples by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 976, 357–367.

[256] Fan, Y., Feng, Y. Q., Da, S. L., Shi, Z. G. (2004). Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum. *Analytica Chimica Acta*, 523, 251–258.

- [257] Huang, C., Hu, B. (2008). Silica-coated magnetic nanoparticles modified with γ -mercaptopropyltrimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd, Cu, Hg, and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 63, 437–444.
- [258] Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D. (2006). Determination of pharmaceuticals in water samples of the Belgian coastal zone and the Scheldt estuary using LC-MS. *Aquatic Toxicology*, 76, 122–159.
- [259] Roux, R., Abi Jaoudé, M., Demesmay, C., Rocca, J. L. (2008). Optimization of the single-step synthesis of hybrid C8 silica monoliths dedicated to nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1209, 120–127.
- [260] Wei, F., Feng, Y. Q. (2011). Methods of sample preparation for determination of veterinary residues in food matrices by porous monolith microextraction-based techniques. *Analytical Methods*, 3, 1246–1256.
- [261] Xu, L., Shi, Z. G., Feng, Y. Q. (2011). Porous monoliths: sorbents for miniaturized extraction in biological analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 3345–3357.
- [262] Chen, M. L., Wei, S. S., Yua, B. F., Feng, Y. Q. (2012). Preparation of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography and its application in determination of nucleosides in urine. *Journal of Chromatography A*, 1228, 183–192.
- [263] Lin, B., Zheng, M. M., Ng, S. C., Feng, Y. Q. (2007). Development of in-tube solid-phase microextraction coupled to pressure-assisted CEC and its application to the analysis of propranolol enantiomers in human urine. *Electrophoresis*, 28, 2771–2780.
- [264] Chen, M. L., Fu, X. M., Liu, J. Q., Ye, T. T., Hou, S. Y., Huang, Y. Q., Yuan, B. F., Wu, Y., Feng, Y. Q. (2012). Highly sensitive and quantitative profiling of acidic phytohormones using derivatization approach coupled with nano-LC-ESI-Q-TOF-MS analysis. *Journal of Chromatography B*, 905, 67–74.
- [265] Wang, H., Campiglia, A. D. (2008). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples by solid-phase nanoextraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 80, 8202–8209.
- [266] Zhu, R., Zhao, W., Zhai, M., Wei, F., Cai, Z., Sheng, N., Hu, Q. (2010). Molecularly imprinted layer-coated silica nanoparticles for selective solid-phase extraction of bisphenol A from chemical cleansing and cosmetics samples. *Analytica Chimica Acta*, 658, 209–216.

- [267] Pamme, N. (2006). Magnetism and microfluidics. *Lab on a chip*, 6, 24–38.
- [268] Guo, J., Wang, W. L., Wang, C. C. (2013). Magnetic colloidal supraparticles: design, fabrication and biomedical applications. *Advanced Materials*, 25, 5196–5214.
- [269] Crosswhite, M., Hunt, J., Southworth, T., Serniak, K., Ferrari, A., Stiegman, A. E. (2013). Development of magnetic nanoparticles as microwave-specific catalysis for rapid, low-temperature synthesis of formalin solutions. *ACS Catalysis*, 3, 1318–1323.
- [270] Coronado, E., Martí-Gastaldo, C., Navarro-Moratall, E., Ribera, A., Tatay, S. (2013). Illustrating the processability of magnetic layered double hydroxides: layer-by-layer assembly of magnetic ultrathin films. *Inorganic Chemistry*, 52, 6214–6222.
- [271] Liu, J., Pearce, C. I., Liu, C. X., Wang, Z. M., Shi, L., Arenholz, E., Rosso, K. M. (2013). $\text{Fe}_{3-x}\text{Ti}_x\text{O}_4$ nanoparticles as tuneable probes of microbial metal oxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 8896–8907.
- [272] Ibarra, I. S., Rodríguez, J. A., Miranda, J. M., Vega, M., Barrado, E. (2011). Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2196–2202.
- [273] Faraji, M., Yamini, Y., Saleh, A., Rezaee, M., Ghambarian, M., Hassani, R. (2010). A nanoparticle-based solid-phase extraction procedure followed by flow injection inductively coupled plasma-optical emission spectrometry to determine some heavy metal ions in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 659, 172–177.
- [274] Chen, G., He, M., Peng, H., Hu, B. (2012). Dithizone modified magnetic nanoparticles for fast and selective solid phase extraction of trace elements in environmental and biological samples prior to their determination by ICP-OES. *Talanta*, 88, 507–515.
- [275] Zhang, J. H., Li, M., Li, Y. B., Li, Z. Y., Wang, F. F., Li, Q., Zhou, W. F., Lu, R. H., Gao, H. X. (2013). Application of ionic liquid supported magnetic dispersive solid-phase microextraction for the determination of acaricides in fruit juice samples. *Journal of Separation Science*, 36, 3249–3255.
- [276] Alcuía-León, M. C., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2013). Magnetically confined hydrophobic nanoparticles for microextraction of endocrine-disrupting phenol from environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 2729–2734.
- [277] Morup, S., Hansen, M., Frandsen, C. (2011) *Nanomaterials*. *Comprehensive Nanoscience and Technology*, 1, 437–491.

- [278] Liu, S., Tian, J., Wang, L., Sun, X. (2012). Highly sensitive and selective colorimetric detection of Ag(I) ion using 3,3',5,5',-tetramethylbenzidine (TMB) as an indicator. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 165, 44–47.
- [279] Quaresma, P., Soares, L., Contar, L., Miranda, A., Osório, I., Carvalho, P. A., Franco, R., Pereira, E. (2009). Green photocatalytic synthesis of stable Au and Ag nanoparticles. *Green Chemistry*, 11, 1889–1893.
- [280] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 15700–15707.
- [281] Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675.
- [282] Hornyak, G. L., Dutta, J., Tibbals, H. F., Rao, A. K. (2008). *Introduction to nanoscience*. Ed. CRC Press, Boca Ratón.
- [283] Mitrano, D. M., Leshner, E. K., Bednar, A., Monserud, J., Higgins, C. P., Ranville, J. F. (2012). Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 115–121.
- [284] Shameli, K., Ahmad, M. B., Zargar, M., Yunus, W. M. Z. W., Ibrahim, N. A., Shabanzadeh, P., Moghaddam, M. G. (2011). Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 271–284.
- [285] Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberths, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van de Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W. H., Van Zijverden, M., Sips, A. J. A. M., Geertsma, R. E. (2009). Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3, 109–138.
- [286] Ju-Nam, Y., Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400, 396–414.
- [287] Mitrano, D. M., Rimmele, E., Wichser, A., Erni, R., Height, M., Nowack, B. (2014). Presence of nanoparticles in wash water from conventional silver and nano-silver textiles. *ACS Nano*, 8, 7208–7219.

- [288] Yin, J., Yang, Y., Hu, Z. Q., Deng, B. L. (2013). Attachment of silver nanoparticles (AgNPs) onto thin-film composites (TFC) membranes through covalent bonding to reduce membrane biofouling. *Journal of Membrane Science*, 441, 73–82.
- [289] Liu, J., Sonshine, D. A., Shervani, S., Hurt, R. H. (2010). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano*, 4, 6903–6913.
- [290] Hunter, R. J. (2001). *Foundations of Colloid Science*. Ed. Oxford University Press, New York.
- [291] Berne, B. J., Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with application to chemistry, biology and physics (3rd Edition)*. Ed. Dover Publications, New York.
- [292] Hassellöv, M., Readman, J. W., Ranville, J. F., Tiede, K. (2008). Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 344–361.
- [293] Qian, X. M., Nie, S. M. (2008). Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 912–920.
- [294] Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 177–182.
- [295] Trzcinski, J., Williams, D. J., Zbik, M. (2015). Can hydrocarbon contamination influence clay soil grain size composition? *Applied Clay Science*, 109–110, 49–54.
- [296] Akaighe, N., Maccuspie, R. I., Navarro, D. A., Aga, D. S., Banerjee, S., Sohn, M., Sharma, V. K. (2011). Humic acid-induced silver nanoparticle formation under environmentally relevant conditions. *Environmental Science and Technology*, 45, 3895–3901.
- [297] Yu, S. J., Yin, Y. G., Liu, J. F. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 15, 78–92.
- [298] Kirstenson, E. M., Ramos, L., Brinkman, U. A. Th. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 96–111.
- [299] Rezaei, F., Hosseini, M. R. M. (2011). New method based on combining ultrasonic assisted miniaturized matrix solid-phase dispersion and homogeneous liquid–liquid extraction for the determination of some organochlorinated pesticides in fish. *Analytica Chimica Acta*, 702, 274–279.

- [300] Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521–2532.
- [301] Míguez-Framil, M., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, P., Álvarez-Freire, I., Tabernero, M. J., Bermejo, A. M. (2010). Matrix solid-phase dispersion on column clean-up/pre-concentration as a novel approach for fast isolation of abuse drugs from human hair. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6342–6349.
- [302] Liu, Q., Shi, J. B., Sun, J. T., Wang, T., Zeng, L. X., Zhu, N. L., Jiang, G. B. (2011). Graphene-assisted matrix solid-phase dispersion for extraction of polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated and hydroxylated analogs from environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 708, 61–68.
- [303] Wang, T., Tong, J., Sun, M., Chen, L. (2011). Fast and selective extraction of chloramphenicol from soil by matrix solid phase dispersion using molecularly imprinted polymer as dispersant. *Journal of Separation Science*, 34, 1886–1892.
- [304] Bogusz, M. J., El Hajj, S. A., Ehaideb, Z., Hassan, H., Al-Tufail, M. (2004). Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography–mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1026, 1–7.
- [305] Pensado, L., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R. (2005). Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1077, 103–109.
- [306] Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J. L. (2007). Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. *Journal of Chromatography A*, 1148, 219–227.
- [307] Pena, M. T., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R. (2008). Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytica Chimica Acta*, 626, 155–165.
- [308] Banjoo, D. R., Nelson, P. K. (2005). Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1066, 9–18.

- [309] Krueve, A., Künnapas, A., Herodes, K., Leito, I. (2008). Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58–66.
- [310] Ramos, J. J., Rial-Otero, R., Ramos, L., Capelo, J. L. (2008). Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A*, 1212, 145–149.
- [311] García-Valcárcel, A. I., Tadeo, J. L. (2009). A combination of ultrasonic assisted extraction with LC-MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. *Analytica Chimica Acta*, 641, 117–123
- [312] Karageorgou, E. G., Samanidou, V. F. (2010). Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk. *Journal of Separation Science*, 33, 2862–2871.
- [313] Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: a clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109.
- [314] Szreniawa-Sztajnert, A., Zabiegala, B., Namiesnik, J. (2013). Developments in ultrasound-assisted microextraction techniques for isolation and preconcentration of organic analytes from aqueous samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 49, 45–54.
- [315] Regueiro, J., Llompart, M., García-Jares, C., García-Monteaudo, J. C., Cela, R. (2008) Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1190, 27–38.
- [316] Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A. (2015). Recent advances in combining microextraction techniques for sample pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 265–274.
- [317] Kataoka, H., Saito, K. (2011). Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 926–950.
- [318] Muñoz-Ortuño, M., Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Pícher, M. T., Campins-Falcó, P. (2014). A cost effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal-sediments. *Journal of Chromatography A*, 1324, 57–63.
- [319] Stephens Jr., De. L., McFadden, T., Heath, O. D., Mauldin, R. F. (1994). The effect of sonication on the recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal stack ash surfaces. *Chemosphere*, 28, 1741–1747.

- [320] Dougherty, R. C. (1981). Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry. *Biomedical Mass Spectrometry*, 8, 283–292.

Abreviaturas

AAS	Ácido acetilsalicílico
Acn	Acenafteno
AE	Alcoholes etoxilados
AF4	Fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AgNPs	Nanopartículas de plata
Ant	Antraceno
AO	Óxidos de amina
AuNPs	Nanopartículas de Oro
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APE	Alquilfenoles etoxilados
APIs	Ingredientes farmacéuticos activos
APTS	(3-aminopropil)trimetoxisilano
AS	Alquil sulfatos
ASE	Extracción acelerada con disolventes
AZAs	Aza-arenos
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BghiP	Benzo(ghi)perileno
BHT	Butilhidroxitolueno (2,6-di-ter-butil-4-metilfenol)
BkF	Benzo(k)fluoranteno
BPA	Bisfenol A
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BZKC (BAC)	Cloruro de benzalconio
Cap-LC	Cromatografía líquida capilar
CC	Coefficiente de correlación (DLS)
CCC	Cromatografía en contracorriente
CE	Comunidad Europea, Electroforesis capilar
CEE	Comunidad Económica Europea
CHA-HS-SPME	Variante de la HS-SPME asistida por enfriamiento-calentamiento
CI	Ionización química
CMA	Concentración máxima admisible
CMC	Concentración micelar crítica
c-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados
CNTs	Nanotubos de carbono
CPE	Extracción en punto de nube

Cri	Criseno
CRM	Material de referencia certificado
c-SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple carboxilados
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DA	Digestión ácida
DAD	Detector de fila de diodos
DahA	Dibenzo(ah)antraceno
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
DEET	N,N-diétil-meta-toluamida
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMA	Directiva Marco del Agua
DMF	Dimetilformamida
DMSPE	Extracción en fase sólida micro dispersiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
μECD	Detector de microcaptura electrónica
ECs	Contaminantes emergentes
EDARs	Estaciones depuradoras de aguas residuales
EDCs	Disruptores endocrinos
EEUU	Estados Unidos
e.g.	Por ejemplo (“ <i>exempli gratia</i> ”)
EI	Impacto electrónico
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
FA-HLLME	Microextracción líquido-líquido homogénea asistida por flotación
FAS	Fluoroacetato de sodio
FDA	Agencia de Alimentos y Drogas
Fen	Fenantreno
FFF	Fraccionamiento de campo-flujo
FID	Detector de ionización de llama
Fl	Fluoreno
FLD	Detector de fluorescencia
Flr	Fluoranteno
FPD	Detector fotométrico de llama
GAC	Carbono activo granular
GC	Cromatografía de gases

GFAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica con Cámara de Grafito
GHS	Sistema global y estandarizado de clasificación de sustancias
HAs	Ácidos húmicos
HBCDs	Hexabromociclodecanos
HCHs	Hexaclorociclohexanos
HDC	Cromatografía hidrodinámica
HF-LPME	Microextracción en fase líquida con fibra hueca
HHCB	1,3,4,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8,-hexametil-ciclopenta[g]-2-benzopirano
HLLE	Extracción líquido-líquido homogénea
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza
I-2959	2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959)
ICP-OES	Espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo
i.e.	Esto es (" <i>id est</i> ")
i.d.	Diámetro interno
IncdP	Indeno(1,2,3-c,d)pireno
IR	Espectroscopía infrarroja
IS	Patrón interno
IT-SPME	Microextracción en fase sólida en tubo
LC	Cromatografía líquida
LLE	Extracción líquido-líquido
LLME	Microextracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MA	Media anual
MAE	Extracción asistida por microondas
Magnetic-IT-SPME	Microextracción en fase sólida en tubo magnética
MALDI	Desorción/ionización por láser asistida por matriz
MeCN	Acetonitrilo
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MeOH	Metanol
MIPs	Polímeros de impronta molecular
MIR	Región del infrarrojo medio
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MNs	Nanomateriales manufacturados

MRM	Modo de monitorización de reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MSD	Detección selectiva de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MS ⁿ	Espectrometría de masas multidimensional (n dimensiones)
MS (SIS)	Trampa iónica
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
MSPME	Microextracción en fase sólida magnética
MSPE	Extracción en fase sólida magnética
MTBSTFA	N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
m/z	Razón masa carga
Naf	Naftaleno
Nano-LC	Nanocromatografía líquida
NCA	Norma de calidad ambiental
NCI	Ionización química negativa
NHS	Uso de disolventes no halogenados
NIST	Instituto Nacional de Normas y Tecnologías
NPAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrogenados
NPs	Nanopartículas
NSAIDs	Antiinflamatorios no esteroideos
OC	Octocrileno
OCs	Contaminantes orgánicos
OHPAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos hidroxigenados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos oxigenados
OPs	Compuestos organofosforados
OTT	Columna tubular abierta de atrapamiento
oxTMB	Forma oxidada de la TMB
PAIHP	Homopolímero de poliaminoimida
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBDEs	Éteres de difenilo polibromados
PBS	Tampón fosfato salino
PCBs	Bifenilos policlorados
PCI	Ionización química positiva
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEEK	Poliéter éter cetona

PHWE	Extracción con agua caliente presurizada
Pir	Pireno
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PM	Partículas del aire
POPs	Contaminantes orgánicos persistentes
PPCPs	Productos farmacéuticos y de cuidado personal
PPY	Polipirrol
PSD	Distribución de tamaño de partícula
PS-DVB	Poli(estireno-divinilbenceno)
PTV	Temperatura de vaporización programada
RB	Rodamina B
RD	Real Decreto
redox	Reacción de oxidación-reducción
RNA	Ácido Ribonucleico
RSD	Desviación estándar relativa
QuEChERS	“quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe”, método de extracción
SAM	Método de adición estándar
SBSE	Extracción adsorbtiva con barra de agitación
SC	Anchura de scan
SDME	Microextracción con gota suspendida
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SIM	Modo de monitorización selectiva de iones
SN	Sistema nervioso
SOM	Materia orgánica del suelo
SPE	Extracción en fase sólida
SP	Partícula individual (modo ICP-MS)
SPME	Microextracción en fase sólida
SPRB	Banda de resonancia de plasmones de superficie
SRM	Modo de monitorización de reacción simple
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
TBA	Terbutilazina
TEOS	Tetraetilortosilicato
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMCS	Trimetilclorosilano
TOF	Tiempo de vuelo
t_r	Tiempo de retención

TRB	Porcentaje de polidifenilsiloxano
TSD	Detector termoiónico específico
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
UE	Unión Europea
UPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución
USAEME	Microextracción con emulsificación asistida por ultrasonidos
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta, región entre 320 y 400 nm
UV-Vis	Espectrofotometría ultravioleta visible
Vac-HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza a vacío
VOCs	Contaminantes orgánicos volátiles
v/v	Volumen/volumen
v/v/v	Volumen/volumen/volumen
w/v	Peso/volumen
w/w	Peso/peso

Listado de Figuras

Figura 1. Evolución en el número de citaciones sobre ECs desde el año 2005. Fuente Web of Science (Noviembre 2015).

Figura 2. Esquema que muestra las etapas del trabajo científico sobre los ECs en su camino a ser considerados como contaminantes prioritarios. Etapas: (1) desarrollo de métodos y estudios ambientales de los ECs en las distintas matrices ambientales. (2) Normativa necesaria para que determinado EC pase a ser contaminante prioritario.

Figura 3. Esquema que muestra las transposiciones hechas hasta el día de hoy de las directivas europeas al marco normativo español.

Figura 4. Esquema que muestra los procesos de transporte de un contaminante en las distintas matrices ambientales.

Figura 5. Esquema que muestra los procesos de transformación química de un contaminante en las distintas matrices ambientales.

Figura 6. Representación del ciclo del agua. Las masas de agua consideradas: (1) hielo, (2) agua edáfica, (3) agua atmosférica, (4) agua subterránea, (5) agua superficial y (6) agua salada. Los procesos involucrados: (A) transpiración, (B) infiltración, (C) evaporación, (D) escorrentía, (E) precipitación y (F) contaminación.

Figura 7. a) Representación esquemática de la IT-SPME en válvula con sus diferentes componentes. b) Columna capilar acoplada a la válvula de inyección de un sistema de LC.

Figura 8. Cromatogramas obtenidos para una mezcla de PAHs (100 µg/L) en IT-SPME en válvula acoplado a Cap-LC utilizando: a) un capilar de PDMS-TRB-35, b) un capilar de PDMS-TRB-35 modificado con CNTs.

Figura 9. a) Evolución en el número de citaciones sobre diclofenaco en el medio ambiente desde el año 2005. Fuente Web of Science (Diciembre 2015). b) Estructura química del diclofenaco.

Figura 10. Estructuras químicas de OPs. a) clorfenvinfos. b) clorpirifos.

Figura 11. Estructuras químicas de las triazinas. a) simazina. b) atrazina. c) TBA.

Figura 12. Evolución en el número de citaciones sobre nanomateriales en el medio ambiente desde el año 2005. Fuente Web of Science (Enero 2016).

Figura 13. Evolución en el número de citaciones sobre AgNPs desde el año 2005. Fuente Web of Science (Enero 2016).

Figura 14. Síntesis de AgNPs con diferentes tamaños y formas que poseen un perfil particular de banda de resonancia de plasmones de superficie (SPRB).

Figura 15. Evolución en el número de citas sobre AuNPs desde el año 2005. Fuente Web of Science (Enero 2016).

Figura 16. Estructura química de: a) CTAB y b) BZKC (R representa una cadena alifática de 12, 14 o 16 carbonos).

Figura 17. Estructura química de: a) quinolina (de los AZAs), b) 1-nitronaftaleno (de los NPAHs), c) 1(2H)-naftalenona (de los OPAHs) y d) 1-hidroxinaftaleno (de los OHPAHs). Nota: para c) la notación (2H) simboliza los 2 hidrógenos menos respecto al naftaleno.

Figura 18. Mecanismo de formación del 1-hidroxinaftaleno y el 1-nitronaftaleno por acción de radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno.

Figura 19. Pictogramas de seguridad que clasifican a las distintas sustancias químicas. Las siglas GHS denotan al sistema global y estandarizado de clasificación de sustancias.

Figura 20. Espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 60 equipado con una fibra óptica.

Figura 21. Espectrómetro Perkin Elmer 4100 ZL (Zeeman) equipado con una cámara de grafito.

Figura 22. Sistema Zetasizer Nano ZS para realizar el análisis por DLS.

Figura 23. Accesorio FTIR 630 que permite la obtención de espectros en el MIR.

Figura 24. Microscopio óptico Nikon.

Figura 25. Microscopios electrónicos de transmisión: a) JEM-1010 (Jeol) y b) Philips Tecnai F20.

Figura 26. Microscopios electrónicos de barrido: a) Hitachi S-4100 y b) Philips XL 30 ESEM.

Figura 27. Sistema HPLC-FLD con compartimento termostático para la columna analítica.

Figura 28. Sistema para realizar Cap-LC-DAD.

Figura 29. Sistema para realizar nano-LC-DAD.

Figura 30. Sistema GC-MS/MS que consiste en un cromatógrafo de gases (a la izquierda) y el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (a la derecha).

Figura 31. Esquema representativo de la extracción en fase sólida magnética (MSPE). Los analitos (OPs) se retienen con la ayuda de un imán de Nd para ser redisoluertos en el disolvente adecuado.

Figura 32. Esquema por pasos del procedimiento MSPD para el análisis de una muestra de sedimentos: a) muestra en el mortero, b) muestra y fase C₁₈ en el mortero antes de mezclar, c) muestra y fase C₁₈ mezcladas en el mortero, d) muestra y fase C₁₈ mezcladas puestas en un cartucho de extracción (SPE).

Figura 33. Sistema de inyección para LC con válvula de 6 puertos convencional. a) Posición de “carga”. b) Posición de “inyección”.

Figura 34. Representación de los sistemas de LC acoplados a detección espectrofotométrica utilizados: a) HPLC-FLD o Cap-LC-DAD con válvula de inyección de volumen fijo. b) IT-SPME-HPLC-FLD o IT-SPME-Cap-LC-DAD con columna capilar de naturaleza variable.

Figura 35. Representación del sistema empleado para la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Figura 36. Representación esquemática de la IT-SPME-nano-LC-DAD que acopla un sistema de inyección capilar con otro nanocromatográfico.

Figura 37. Esquema de la etapa de inyección en el sistema de IT-SPME-nano-LC-DAD: a) válvula 1 en posición de “carga”, b) válvula 1 en posición de “inyección”, c) válvula 2 en posición de “carga”, d) válvula 2 en posición de “inyección”.

Figura 38. Esquema de la formación del nanomaterial adsorbente magnético. (1) NPs Fe₃O₄-oleato. (2) (arriba) Estructuras micelares de NPs de Fe₃O₄-CTAB-oleato. (abajo) Micelas de CTAB. (3) Nanomaterial adsorbente de Fe₃O₄ en matriz de SiO₂/PEG.

Figura 39. Etapas de la síntesis para la obtención del nanomaterial adsorbente magnético y finalmente, los capilares basados en MNPs en matriz de SiO₂/PEG.

Figura 40. Esquema de la síntesis de capilares basados en s-SWCNTs o c-MWCNTs en PDMS.

Figura 41. Síntesis fotoquímica de AgNPs empezando en la generación de un radical cetilo por la excitación del I-2959 bajo irradiación UVA, seguido de la reducción de la Ag⁺. Aunque el citrato no se muestra en el esquema, es fundamental para estabilizar las AgNPs producidas (agente de capping o estabilizante).

Figura 42. Síntesis de AgNPs siguiendo el método de Frank-Mirkin. La primera síntesis de color amarillo se obtuvo sin añadir ni H_2O_2 ni KBr; la segunda de color rojo añadiendo H_2O_2 ; la tercera de color azul, H_2O_2 y KBr.

Figura 43. Imágenes SEM para la caracterización de los capilares (vista transversal): a) capilar comercial de PDMS TRB-5 (40 μm), b) capilar basado en c-SWCNTs en PDMS TRB-5 (200 nm), c) capilar basado en c-MWCNTs en PDMS TRB-5 (2 μm), d) capilar comercial de SiO_2 fundida (40 μm), e) capilar basado en NPs de Fe_3O_4 esféricas en matriz de SiO_2 /PEG (200 nm) y f) capilar basado en NPs de Fe_3O_4 en forma de bastón en matriz de SiO_2 /PEG (200 nm). Para más información ver la Tabla 25.

Figura 44. Optimización del tiempo de transferencia. a) Columnas capilares basadas en PDMS. b) Columnas capilares basadas en SiO_2 . Nota: perfiles similares se obtuvieron para el resto de los capilares ensayados. El capilar 1 fue similar al 3 (15 s), 6 y 8 al 7 (15 s), 9 y 11 al 10 (20 s). Para mayor información, ver la Tabla 25.

Figura 45. Optimización de las dimensiones de los capilares. Cromatogramas para un patrón de diclofenaco de 400 ng/mL. a) Efecto del largo del capilar para columnas basadas en PDMS (capilares 2 y 3) y para las basadas en SiO_2 (capilares 5, 6 y 7). b) Efecto del i.d. para columnas basadas en SiO_2 (capilares 7 y 9).

Figura 46. Eficiencias de extracción (Ef. Ext.) para las 12 columnas capilares ensayadas en la IT-SPME-nano-LC.

Figura 47. Cromatogramas de la IT-SPME-nano-LC utilizando el capilar 7 como columna capilar de muestras farmacéuticas convenientemente diluidas (Voltarén, $n=2$).

Figura 48. Estudios de preconcentración. a) Cromatogramas para la IT-SPME-nano-LC utilizando el capilar 7 como columna capilar de un patrón de diclofenaco de 100 ng/mL variando el número de veces que se llenó el loop PEEK de la válvula 1 (n° de cargas) en cada análisis: 1 (b1), 2 (b2), 3 (b3), 5 (b4) y 6 (b5) veces. b) Representación de la eficiencia de extracción (Ef. Ext.) vs n° de cargas para el capilar 7.

Figura 49. Imagen obtenida por TEM de NPs de Fe_3O_4 .

Figura 50. Curvas magnetización (M) vs campo magnético aplicado (B). Comparación de los diferentes comportamientos magnéticos.

Figura 51. Caracterización del nanomaterial de Fe_3O_4 - SiO_2 . a) Imagen de HRTEM. Las NPs de Fe_3O_4 están marcadas en amarillo. b) Histograma de la distribución de tamaños de las NPs (“f. rel.”: frecuencia relativa).

Figura 52. Cromatogramas de una muestra fortificada antes y después (sobrenadante procesado) de realizar la MSPE. (1) Clorfenvinfos. (2) Clorpirifos.

Figura 53. Cromatograma de un patrón de 10 $\mu\text{g/L}$ de (1) clorfenvinfos y (2) clorpirifos procesado por MSPE-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Figura 54. Estudio de la optimización del volumen de muestra a procesar para OPs en la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Figura 55. Influencia del campo magnético (B) en la extracción de OPs: 10 y 3 $\mu\text{g/L}$ para clorfenvinfos y clorpirifos respectivamente.

Figura 56. Influencia del campo magnético (B) en la extracción de triazinas: 30 $\mu\text{g/L}$ de cada una.

Figura 57. Resumen comparativo de los métodos utilizados: uso de capilares comerciales de PDMS TRB-5 y magnéticos a $B = 0 \text{ G}$ y $B_{\text{máx}}$ (200 G para OPs y 150 G para triazinas).

Figura 58. Magnetic-IT-SPME. a) Explicación por etapas de los fenómenos ocurridos dentro del capilar al momento de la inyección: 1) carga de los analitos en el sistema a B fijo (\gg), 2) adsorción de los analitos en el adsorbente, 3) inyección-desorción de los analitos al resto del sistema a B fijo (\ll). b) Imagen de SEM del interior del capilar magnético (escala 5 μm).

Figura 59. Cromatogramas para la Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD de: a) 10 $\mu\text{g/L}$ de (1) clorfenvinfos y 2 $\mu\text{g/L}$ de (2) clorpirifos a 200 G. b) 30 $\mu\text{g/L}$ de (3) simazina, (4) atrazina y (5) TBA a 150 G.

Figura 60. a) Oxidación de la TMB por Ag^+ . b) Representación esquemática de la detección “in situ” de Ag^+ residual después de una síntesis de AgNPs. c) Visualización colorimétrica “in situ” (en este caso, las NPs fueron fortificadas con 4 ppm de Ag^+).

Figura 61. Síntesis F3 preparada usando I-2959 como fotoiniciador y citrato como agente estabilizante, irradiación UVA durante 15 min. (izquierda) Espectro de absorción. (derecha) Imagen de TEM e histograma con la distribución de partículas.

Figura 62. Síntesis TCA preparada térmicamente calentando una mezcla de glicerol-agua (40% (v/v) de glicerol) en presencia de citrato a 95°C. (izquierda) Espectro de absorción (dilución 2:15). (derecha) Imagen de TEM e histograma con la distribución de partículas.

Figura 63. Síntesis TN4 preparada térmicamente por reducción con NaBH_4 (0.1%) en donde la mezcla de reacción se dejó bajo agitación durante una hora a 70°C. (izquierda) Espectro

de absorción (dilución 2:12). (derecha) Imagen de TEM e histograma con la distribución de partículas.

Figura 64. Optimización del método colorimétrico. a) Variación de la respuesta del método con la concentración de TMB (patrón de Ag^+ de 4 mg/L). b) Variación de la pendiente (b) de la curva de calibrado en función del tiempo de reacción.

Figura 65. Estudios preliminares. a) Espectros de absorción obtenidos para un blanco de síntesis después de aplicar el método (línea negra) y para AgNPs en presencia de tampón AcNa/AcH (línea roja). b) Espectros de absorción de las muestras (1-3) después de aplicar el método y fotos de los viales respectivos. Muestra que corresponde a: (1) disolución resultante para un patrón de Ag^+ de 4 mg/L, (2) dispersión de AgNPs, (3) dispersión de AgNPs fortificadas con patrón de Ag^+ de 4 mg/L.

Figura 66. Calibración por el SAM y comparativa con la calibración externa. a) Espectros de absorción para las fortificaciones con patrón de Ag^+ en el rango 0-15 mg/L sobre la síntesis FIA procesadas por el método desarrollado. b) Comparación de las curvas obtenidas por el SAM (círculos negros) y calibración externa (círculos blancos).

Figura 67. Espectros de absorción registrados después de adición de TMB/tampón a: (1) dispersión de AgNPs, (2) dispersión de AgNPs eluidas por cartucho SCX, (3) dispersión fortificada con 4 mg/L de Ag^+ pasada por cartucho SCX. El espectro obtenido para AgNPs mezcladas con tampón (4) fue añadido para la comparación.

Figura 68. Comparativa UV-Vis/TEM. Espectro de absorción de las AgNPs con tamaños promedios de partícula calculados por análisis de TEM: a) diferentes y b) similares.

Figura 69. Optimización de las condiciones y relación señal analítica-tamaño de partícula en Cap-LC. a) Cromatogramas de AgNPs (1a) sin o con columna: (2a) Jupiter, (3a) Zorbax de tamaño de partícula 5 μm , (4a) Zorbax de tamaño de partícula 3.5 μm , (5a) Zirchrom. b) Cromatogramas de AgNPs con diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: (1b) 0.5, (2b) 1.0 y (3b) 1.5 mM. (c) Cromatogramas de AgNPs con diferentes flujos: (1c) 5, (2c) 10 y (3c) 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. d) Espectros de absorción UV-Vis de AgNPs (1:2) diluidas con (1d) agua y (2d) fase móvil, y (3d) el blanco de síntesis. Cromatogramas obtenidos (e) sin columna y (f) con columna Jupiter para AgNPs de: (1) 12.23, (2) 13.92 y (3) 16.19 nm en ambas situaciones.

Figura 70. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 17.32 nm considerada como patrón. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:8). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Figura 71. Resultados de la calibración en Cap-LC. a) curva de calibrado utilizando como patrones AgNPs de 17.32 nm y sus respectivas diluciones. b) Cromatogramas para: (1) AgNPs de 0.431 nM y (2) blanco.

Figura 72. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 12.23 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:16). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Figura 73. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 13.92 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:16). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Figura 75. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 16.19 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:16). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Figura 76. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 25.57 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:8). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:8). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Figura 77. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 38.15 nm. a) Espectro UV-Vis (dilución 1:15). b) Cromatograma en Cap-LC (dilución 1:2). c) Histograma de distribución de tamaños obtenido por TEM (arriba a la derecha, imagen TEM).

Figura 78. Relación de la señal de Cap-LC-DAD con [AgNPs]. a) Curva de calibrado obtenida utilizando como puntos 7 síntesis de NPs con diferentes tamaños. b) Representación Area vs [AgNPs] a 3 niveles de concentración diferentes (0.21, 0.42 y 0.63 nM) donde cada medida proviene de una muestra de tamaño distinto.

Figura 79. Estudios de AgNPs no esféricas. a) resultados en Cap-LC: (1a) cromatograma a 600 nm para una dilución 1:8 de AgNPs y (2a) espectro DAD. b) Información adicional obtenida: (1b) espectro UV-Vis para una dilución 1:8 de AgNPs, (2b) imagen TEM y (2c) fotografía de un vial conteniendo nanoprismas.

Figura 80. Estudios de estabilidad. a) Análisis por TEM: histograma de la distribución de partículas e imagen para la síntesis de 16.72 nm (S2). b) Resultados en Cap-LC para una dilución 1:8 de AgNPs de 15.36 nm (S1) y S2. c) Experimentos UV-Vis: espectros para S1 y S2 obtenidos para diluciones 1:16 en agua (línea azul o roja) y EtOH (línea negra). d) Espectros UV-Vis para S1 y S2 de series de muestras en las cuales se añadieron BZKC de 0 (línea azul o roja) a 112 μ M (series desde la línea verde más clara a la más oscura, concentraciones crecientes). Para S1, la tendencia de variación de señales fue confirmada, hecho no observado para S2.

Figura 81. Estudios preliminares en la metodología IT-SPME-Cap-LC-DAD. Cromatogramas y espectros DAD (esquina superior derecha de las figuras) para: a) AgNPs de 17.32 nm con volúmenes de inyección de (1) 32, (2), 16 y (3) 8 μ L; A y B representan el máximo de la señal (1) en donde los espectros DAD fueron medidos. b) 8 μ L de muestras de (1) 38.15 y (2) 12.23 nm; los espectros DAD fueron medidos en el máximo de señal de cada una de ellas. c) Muestra de 17.32 nm (1) directamente inyectada en el loop lleno de agua y (2) inyectada después de ser diluida con agua fuera del sistema; A, B y C representan los máximos de señal en donde los espectros DAD fueron medidos.

Figura 82. a) Cromatograma de un blanco (loop lleno con agua) y espectro DAD del último pico (arriba a la derecha) utilizando un capilar de PDMS TRB-35 de 70 cm de largo. b) Cromatogramas obtenidos utilizando diferentes adsorbentes (variando en su porcentaje de difenilo) para un capilar de PDMS de 35 cm.

Figura 83. Metodología IT-SPME-Cap-LC-DAD. Cromatogramas obtenidos para síntesis de AgNPs de diámetro: a) 12.23, 13.92 y 16.19 nm, b) 25.57 y 38.15 nm. c) Representación de Señal (razón de áreas 2do pico:1er pico) vs d^3 para las diferentes AgNPs. d) Esquema del procedimiento de IT-SPME-Cap-LC: las partículas de una determinada síntesis se distribuyen y separan en grupos cuando atraviesan el sistema cromatográfico.

Figura 84. Calibración del método IT-SPME-Cap-LC-DAD. a) Cromatogramas obtenidos para un blanco y 5 niveles de concentración empleando como patrón la síntesis de AgNPs de 17.32 nm en un rango de 0-0.33 nM. b) Curva de calibrado utilizando como patrón la síntesis de AgNPs de 17.32 nm.

Figura 85. Cromatogramas obtenidos a 530 nm para síntesis de AuNPs comerciales: a) sin diluir y b) diluidas con agua de (1) 5, (2) 20 y (3) 40 nm.

Figura 86. Cromatogramas obtenidos a 530 nm para un patrón A (AuNPs de 20 nm, dilución 1:8), un patrón B (AuNPs de 5 nm, dilución 1:16) y una mezcla A+B (AuNPs de 20 nm, dilución 1:8, más AuNPs de 5 nm, dilución 1:16).

Figura 87. Cromatogramas en el método IT-SPME-Cap-LC-DAD para AgNPs de: (1) 12.34 nm y (2) 12.83 nm (dilución 1:16).

Figura 88. Histogramas de las distribuciones de tamaño obtenidos por TEM para AgNPs de: a) 12.34 y b) 12.83 nm. Arriba a la derecha: Imagen TEM.

Figura 89. Correlogramas de DLS (CC, coeficiente de correlación, en el tiempo) para: a) AgNPs de (1) 12.34 y (2) 12.83 nm, b) AgNPs de 17.32 nm (1) diluidas y (2) sin diluir, y c) AuNPs de diferentes tamaños.

Figura 90. Estudio de surfactantes: a) cromatogramas y b) correlogramas para AgNPs de 12.23 nm en presencia de (1) 0, (2) 30 y (3) 100 μM de CTAB.

Figura 91. Caracterización de la síntesis de AgNPs de 17.3 nm. a) Histograma de distribución de tamaños de partícula e imagen (arriba a la derecha) obtenidos por TEM. b) Espectro UV-Vis para una dilución 1:8.

Figura 92. Caracterización de los suelos. Espectros IR para los 4 suelos estudiados obtenidos por ATR-FTIR.

Figura 93. Caracterización de los suelos. a) Gráfico de barras para la PSD en cada suelo e b) imágenes de microscopía óptica para cada fracción del suelo huerto tamizado: (1) bajo 100 μm , (2) 100-200 μm , (3) 200-300 μm , (4) 300-400 μm , (5) sobre 400 μm .

Figura 94. Caracterización de suelos por microscopía óptica. a) Imagen de una muestra de suelos (mezcla) de microscopio óptico Eclipse (escala 500 μm). Histogramas de distribución de tamaños obtenidos por: b) microscopía óptica (f: frecuencia) y c) tamizado-pesada de las diferentes fracciones: (1) bajo 100 μm , (2) 100-200 μm , (3) 200-300 μm , (4) 300-400 μm , (5) sobre 400 μm .

Figura 95. a) Espectros UV-Vis de los sobrenadantes después de contaminar muestras de suelo con: (A) AgNPs, (SB) blanco de síntesis y (W) agua. b) Imagen de TEM del sobrenadante contaminado con AgNPs. c) Espectros UV-Vis de adiciones sucesivas de AgNPs sobre el sobrenadante contaminado con el blanco de síntesis (SB). d) Espectro UV-Vis que muestra la SPRB de la síntesis de AgNPs utilizada.

Figura 96. a) Espectros UV-Vis de los sobrenadantes de disoluciones mezcladas con suelo de: (SB) blanco de síntesis y (citrato) citrato trisódico.

Figura 97. Estudios en Cap-LC-DAD. a) Cromatogramas para muestras de AgNPs: (muestra S) sin procesar y (muestra P) procesadas (dilución 1:8). b) Espectros DAD de los picos obtenidos (en el máximo) en las 3 series (A, SB y W) para los 4 suelos (en este caso, medidos en cromatogramas de las series para el suelo de huerto).

Figura 98. Estudios en Cap-LC-DAD. Variación de las señales cromatográficas en el tiempo (rango 0-80 min) para las 3 series ((A) AgNPs, (SB) blanco de síntesis y (W) agua) en cada uno de los 4 suelos.

Figura 99. Calibración para el método IT-SPME-Cap-LC-DAD utilizando como patrón una síntesis de AgNPs de 17.3 nm y sus diluciones.

Figura 100. a) Curva de calibrado en IT-SPME-Cap-LC-DAD para los HAs en un rango entre 0-500 mg/L. b) Cromatogramas obtenidos para patrones con [HAs] de: (1) 0.5, (2) 2, (3) 5, (4) 10, (5) 25 y (6) 50 mg/L. c) Espectro DAD para (4).

Figura 101. a) Cromatogramas para: (1) AgNPs (dilución 1:16), (2) muestra A (dilución 1:16, suelo de huerto) y (3) patrón de HAs (10 mg/L). b) Espectros DAD para: (1A) primero y (1B) segundo pico de las AgNPs, (2A) primero y (2B) segundo pico de la muestra A y (3) primer pico del patrón de HAs. c) Cromatogramas para AgNPs: (A) en ausencia, y en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%) después de (B) 40, (C) 45 y (D) 50 min de reacción.

Figura 102. Cromatogramas para suelos (1) compost, (2) de monte, (3) de huerto y (4) urbano correspondientes a: muestras A, inyecciones: a) en ausencia y b) en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%); para muestras SB, inyecciones: c) en ausencia y d) en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%). Nota: diluciones 1:16 para las muestras, exposición de las muestras al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de 50 min.

Figura 103. Cromatogramas obtenidos midiendo las muestras F en a) ausencia y b) presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1%) para diferentes fracciones de suelo urbano: (1) fracción gruesa o sobre 400 μm , (2) 300-400 μm , (3) 200-300 μm , (4) 100-200 μm y (5) bajo 100 μm . Nota: diluciones 1:16 para la muestras, exposición de las muestras al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de 50 min.

Figura 104. Imágenes obtenidas por SEM (escala de 500 μm) para los 4 suelos estudiados: (1) compost, (2) de monte, (3) de huerto y (4) urbano.

Figura 105. Cromatogramas obtenidos a los pares de longitudes de onda de trabajo para: (a) un patrón de PAHs de concentración 0.58 ng/mL; y los extractos finales recogidos después de triturar 400 mg de (b) C_{18} sin tratar, y (c) C_{18} lavada previamente con 1 mL de MeCN.

Figura 106. Cromatogramas a 265/335 nm y 265/375 nm de los extractos recogidos después de triturar 400 mg de fase C_{18} luego de sonicación con: (a) acetona, (b) MeOH, (c) MeCN, (d) n-hexano y (e) THF.

Figura 107. Efecto del tiempo de sonicación en los cromatogramas del fondo obtenidos de lavar la fase C_{18} con acetona por UAE. Las señales medidas a los t_r y $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ óptimos para algunos de los PAHs estudiados: (Δ) Naf, ($*$) Fl, ($*$) Fen, (\circ) Ant, (\bullet) Pir, (\square) BaA.

Figura 108. Cromatogramas obtenidos a las $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de trabajo para: a) extractos recolectados después de lavar el adsorbente con el procedimiento propuesto, y b) un patrón de PAHs de 0.58 ng/mL para cada compuesto.

Figura 109. Cromatogramas a 265/335 nm y 265/375 nm de los extractos obtenidos luego de triturar gel de sílice (línea continua) y florisil (línea discontinua): (a) después de utilizar el procedimiento de lavado propuesto y (b) sin tratar los adsorbentes.

Figura 110. Cromatogramas obtenidos a 265/335 nm y 265/375 nm para: (a) muestra real (100 mg de sedimento marino) y (b) la misma muestra fortificada con 20 ng/g de PAHs (para cada compuesto), ambos obtenidos con fase C₁₈ tratada con el procedimiento propuesto; la figura también muestra los cromatogramas obtenidos bajo las mismas condiciones sin muestra (c). Los picos correspondientes a los PAHs se marcaron con una flecha.

Figura 111. Cromatogramas obtenidos a 265/425 nm y 265/475 nm para: (a) muestra real (100 mg de sedimento marino) y (b) la misma muestra fortificada con 20 ng/g de PAHs (para cada compuesto), ambos obtenidos con fase C₁₈ tratada con el procedimiento propuesto; la figura también muestra los cromatogramas obtenidos bajo las mismas condiciones sin muestra (c). Los picos correspondientes a los PAHs se marcaron con una flecha.

Figura 112. Áreas de pico normalizadas ($Area_N$) obtenidas para disoluciones patrón de PAHs (1.12 ng/mL) en diferentes mezclas de disolvente/agua procesadas por IT-SPME. Volumen procesado: 4 mL para isopropanol/agua y 3 mL para las otras mezclas.

Figura 113. Respuestas obtenidas para sedimentos marinos contaminados naturalmente procesados por UAE con diferentes disolventes: (a) áreas de pico absolutas ($Area$) y (b) áreas de pico normalizadas ($Area_N$). Condiciones: tiempo de extracción de 10 min, temperatura de extracción de 30°C.

Figura 114. Respuestas obtenidas (Áreas de pico normalizadas, $Area_N$) para sedimentos marinos contaminados naturalmente procesados por UAE con diferentes tiempos de extracción (i.e. sonicación) para: (a) MeOH, (b) acetona y (c) MeCN. Temperatura de extracción de 30°C.

Figura 115. Respuestas obtenidas (Áreas de pico normalizadas, $Area_N$) para sedimentos marinos contaminados naturalmente procesados por UAE con diferentes temperaturas (T) de extracción para: (a) MeOH, (b) acetona y (c) MeCN. Tiempo de extracción de 30 min.

Figura 116. Cromatogramas obtenidos por el método UAE-IT-SPME-HPLC-FLD propuesto para un sedimento marino fortificado con PAHs (8.33 ng/g de cada compuesto). λ_{ex} : 235 nm en el intervalo 0-7 min y 265 nm desde 7 min hasta el final del análisis. λ_{em} : (a) 335 nm en el intervalo de 0-10.5 min y 515 nm desde 10.5 min hasta el final del análisis; (b) 375 nm;

(c) 425 nm; (d) 475 nm. Muestra, línea roja (cromatogramas de abajo); muestra fortificada, línea azul (cromatogramas de arriba).

Figure 117. Chemical reactions for the different processes of ionization (EI and PCI). Electron capture ionization is represented as it may occur in NCI.

Figure 118. The oven temperature program used in the GC-MS method for the determination of PAHs.

Figure 119. The oven temperature program used in the methods for the determination of PAH derivatives. GC-MS methods involving (red line) EI and (blue line) CI.

Figure 120. Chromatogram obtained (up) for the 18 PAH derivatives (10 mg/L of each one, marked with *) in GC-MS/MS (EI). Zoom: (A) OH1, (B) O and OH2, (C) N11 and N12. For more details, see Table 58.

Figure 121. Chromatogram obtained for the 17 PAH derivatives and the IS (2 mg/L of each one, marked with *) in GC-MS (EI).

Figure 122. Chromatograms obtained for the 17 PAH derivatives and the IS (0.4 mg/L of each one, marked with *) in GC-MS: (blue line) NCI and (red line) PCI.

Figure 123. Comparison of the 3 proposed methods in terms of sensitivity (i.e. slope values). (1) GC-MS (EI), (2) GC-MS (CI) and (3) GC-MS/MS (EI).

Listado de Tablas

Tabla 1. Grupos y ejemplos representativos de ECs. Los asteriscos indican los compuestos que han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Unión Europea.

Tabla 2. Parámetros operacionales y dimensiones empleadas en el acoplamiento IT-SPME con sistemas miniaturizados.

Tabla 3. Aplicaciones en procedimientos fuera de línea de nanomateriales con NPs magnéticas en análisis de muestras biológicas.

Tabla 4. Materiales adsorbentes empleados en capilares para IT-SPME en válvula acoplado en línea con cromatografía.

Tabla 5. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de algunos productos farmacéuticos medidos en aguas residuales en distintos países del mundo. ND representa una concentración por debajo del límite de detección (LOD). Datos extraídos de [53,99,100].

Tabla 6. Propiedades físicas de algunos NSAIDs reportadas en la literatura.

Tabla 7. Métodos analíticos para la determinación de diclofenaco en los últimos 10 años.

Tabla 8. Clasificación de pesticidas y su modo de acción sobre el blanco de aplicación. Datos obtenidos de [115,117]. Los asteriscos indican a los pesticidas incluidos en la lista de contaminantes prioritarios en la Directiva 2013/39/UE.

Tabla 9. Propiedades físico-químicas de los OPs analizados. Los valores no reportados en la bibliografía se designan por “nr”.

Tabla 10. Propiedades físico-químicas de las triazinas analizadas.

Tabla 11. Métodos analíticos para la determinación de OPs en los últimos 10 años.

Tabla 12. Métodos analíticos para la determinación de triazinas en los últimos 10 años.

Tabla 13. Métodos analíticos para la caracterización de NPs en los últimos 20 años.

Tabla 14. Métodos analíticos para la determinación de AgNPs en los últimos 10 años.

Tabla 15. Clasificación de surfactantes y ejemplos representativos de cada tipo.

Tabla 16. Estructura química de los PAHs estudiados. Los números denotan el pertenecer a la lista de contaminantes prioritarios de: (1) USEPA, (2) UE y (3) si están clasificados como sustancias peligrosas en la lista de la UE.

Tabla 17. Propiedades físico-químicas de algunos de los PAHs (Fen, Flr, Pir, BaA, BbF, BkF, IncdP, BghiP, DahA) [208,209].

Tabla 18. Límites máximos aceptables de PAHs en suelos destinados a diferentes usos y en organismos en distintos compartimentos del medio ambiente.

Tabla 19. Derivados de PAHs, clasificados por familias, estudiados en la presente Tesis.

Tabla 20. Métodos analíticos para la determinación de PAHs en suelos y sedimentos en los últimos 10 años.

Tabla 21. Reactivos empleados en esta Tesis, con sus respectivos pictogramas de seguridad y las casas comerciales de donde se han adquirido.

Tabla 22. Condiciones experimentales para los métodos de LC acoplados a IT-SPME utilizados en la Tesis.

Tabla 23. Condiciones experimentales para los métodos de GC utilizados en la Tesis.

Tabla 24. Muestras por analito estudiadas en la presente Tesis.

Tabla 25. Características de los capilares utilizados en el estudio del diclofenaco.

Tabla 26. Parámetros analíticos obtenidos para cada columna capilar ensayada durante la calibración del método IT-SPME-nano-LC-DAD.

Tabla 27. Características adicionales de los capilares utilizados en los métodos de IT-SPME-nano-LC-DAD y de IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Tabla 28. Comparativa entre diferentes parámetros de la IT-SPME-nano-LC-DAD (capilar 7) e IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Tabla 29. Susceptibilidad magnética total (χ) para los analitos estudiados.

Tabla 30. Parámetros analíticos para la MSPE-IT-SPME-Cap-LC.

Tabla 31. Recuperación y remediación en el método MSPE-IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Tabla 32. Eficiencias de extracción para los compuestos estudiados utilizando un capilar de PDMS TRB-5 y uno magnético sintetizado trabajando a $B = 0G$.

Tabla 33. Calibración del método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD para el análisis de OPs.

Tabla 34. Precisión (RSD), LODs y LOQs del método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD para el análisis de OPs.

Tabla 35. Precisión y LODs en el método Magnetic-IT-SPME-Cap-LC-DAD para el análisis de triazinas.

Tabla 36. Resultados del estudio de recuperación en aguas para OPs y triazinas.

Tabla 37. Estrategias sintéticas utilizadas para obtener AgNPs.

Tabla 38. Parámetros analíticos obtenidos para el método UV-Vis desarrollado.

Tabla 39. Concentraciones de Ag^+ total obtenida para todas las síntesis analizadas por el método colorimétrico de la TMB.

Tabla 40. Parámetros analíticos obtenidos para el método de Cap-LC-DAD desarrollado.

Tabla 41. Estimación de tamaños de diferentes AgNPs por el método Cap-LC-DAD.

Tabla 42. Concentraciones y diluciones de las AgNPs procesadas por Cap-LC-DAD.

Tabla 43. Parámetros analíticos para el método IT-SPME-Cap-LC-DAD desarrollado.

Tabla 44. Concentraciones y diluciones de las AgNPs procesadas por IT-SPME-Cap-LC-DAD (se inyectaron también diluciones 1:16).

Tabla 45. PSD (distribución del tamaño de partícula). Porcentajes (%) de cada fracción para los 4 suelos estudiados.

Tabla 46. Porcentaje de retención de AgNPs (AgNPs (%)) cuantificado por IT-SPME-Cap-LC-DAD en los diferentes suelos contaminados y porcentaje relativo de plata (Ag (%)) detectado por microanálisis de SEM.

Tabla 47. Porcentaje de retención de las AgNPs (AgNPs (%)) en las distintas fracciones y total cuantificado por IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Tabla 48. Microanálisis de SEM (K y L representan radiaciones características). Composición elemental en los 4 suelos estudiados.

Tabla 49. Condiciones de detección y tiempos de retención para los PAHs estudiados.

Tabla 50. Efecto del volumen de disolvente en los cromatogramas del fondo obtenidos de la fase C_{18} lavada con acetona por UAE. Las señales medidas a los t_r y $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ óptimos para algunos de los PAHs estudiados.

Tabla 51. Condiciones de cuantificación del detector en el método desarrollado.

Tabla 52. Parámetros analíticos para la determinación de PAHs en sedimentos marinos.

Tabla 53. Recuperaciones absolutas (i.e. eficiencias de extracción) en el método UAE-IT-SPME-HPLC-FLD propuesto.

Tabla 54. Evaluación de la exactitud del método UAE-IT-SPME-HPLC-FLD para la determinación de PAHs en sedimentos marinos.

Table 55. Selected m/z for the studied PAHs.

Table 56. Analytical parameters of the proposed GC-MS for PAH determination.

Table 57. Accuracy and precision in the analysis of samples by GC-MS.

Table 58. GC-MS/MS (EI) optimization.

Table 59. GC-MS (EI) optimization.

Table 60. GC-MS (CI) optimization.

Anexos

Anexo 1.

Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments.

Moliner-Martínez, Y., González-Fuenzalida, R. A., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P., Verdú-Andrés, J.



Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: Application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments

Y. Moliner-Martínez, R.A. González-Fuenzalida, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2012

Received in revised form

11 September 2012

Accepted 12 September 2012

Available online 17 September 2012

Keywords:

Matrix solid-phase dispersion
Polycyclic aromatic hydrocarbons
Ultrasonic assisted extraction
Marine sediments

ABSTRACT

This study shows that ultrasonic assisted extraction is a good practise for removing impurities from sorbents used for matrix-solid phase dispersion (MSPD). A previous washing of the sorbent with an organic solvent or mixture of solvents eliminates part of the interferences, but this treatment is not enough for the quantification of PAHs at ng/g levels. It is demonstrated that the determination of traces of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in solid samples processed by matrix-solid phase dispersion (MSPD) may be severely affected by the presence of sorbent impurities. Different extraction solvents and sonication conditions have been tested, and on the basis of the results obtained a new approach is presented for cleaning sorbents typically used in MSPD such C₁₈, silica or Florisil. The utility of the described approach has been illustrated by analysing by liquid chromatography and fluorescence detection different marine sediments.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the past years many innovative extraction techniques have been developed as alternative to classical multi-step methods for sample treatment. Among them, MSPD is a sample preparation technique with increasing acceptance for the analysis of organic compounds in solid, semi-solid and viscous samples [1–3]. This technique involves the grinding of a portion of the sample with an abrasive solid material, typically a solid-phase extraction (SPE) phase. The grinding process disrupts the sample structure and disperses it over the surface of the extractive material. The blend is then packed into a pre-fritted SPE tube, and finally the analytes are selectively desorbed with an appropriate solvent. In many assays, the purity of the final MSPD extracts is improved by subsequent extraction, many often by SPE, or simply by packing an extra sorbent layer at the bottom of the MSPD tube. In such a way, the analytical process is considerably simplified, and typical problems encountered when using other treatments (e.g. emulsion formation) are avoided. This technique also reduces sample and solvents consumption and does not need special instrumentation. Moreover, MSPD is well-suited for miniaturization [4], and in recent years, different studies have shown the possibility of

coupling it with modern forms of extraction such as homogeneous liquid–liquid extraction [5] or in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) [6]. Owing to its inherent advantages, MSPD is increasingly used, and a wide variety of applications have been described in the environmental and toxicological fields as well as in food analysis [2,7–10].

The selectivity and efficiency of MSPD is mainly dependent on the sorbent and extractive solvent used. Consequently, the optimization of MSPD procedures typically entails the comparison of the results obtained with different sorbent/solvent combinations. As regards the sorbents, most reported methods used reversed-phase SPE materials, such as C₁₈ and C₈ phases for the dispersion and retention of lipophilic analytes, whereas silica and alumina particles are the normal-phase sorbents most frequently used. More recently, different methods have been reported that use alternative sorbents such as graphene [11] and polymeric materials, including imprinted molecular polymers [12].

In a vast majority of the reported assays, sorbent selection relies on the background chromatograms obtained when processing portions of the samples. Peaks in the background chromatograms are generally attributed to matrix components, and the presence in the final extracts of interfering compounds coming from the sorbents has received little attention [13]. However, sorbent impurities may impact negatively the results, particularly in trace analysis. A typical example is the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Because PAHs are widespread environmental

* Corresponding author. Tel.: +34 963544034; fax: +34 963544443.
E-mail address: jorge.verdu@uv.es (J. Verdú-Andrés).

pollutants of both natural and anthropogenic origin, they have to be controlled in solid and semisolid samples such as food, soils, sediments and sewage sludge. During the past decade different works have illustrated the utility of MSPD for the determination of these compounds in such matrices [6,13–17]. In general, sorbents are directly mixed and blended with the samples, although some procedures incorporate a previous washing of the sorbent to eliminate possible contaminants. However, the effect of the presence of sorbent impurities in the quantification of traces of PAHs has not been systematically studied.

In the present paper we have investigated the effect of the presence of sorbent impurities in the quantification of PAHs. Based on a previous method developed for the quantification of PAHs in biota samples, a C₁₈ phase has been used as MSPD sorbent, and the extracts have been analysed by liquid chromatography and fluorescence detection, whereas IT-SPME has been adopted for on-line enrichment of the analytes [6]. We have evaluated and compared different treatments of the C₁₈ phases, including previous washing of the sorbent and ultrasonic assisted extraction of the sorbent impurities. On the basis of the results obtained, a new approach is presented for conditioning C₁₈ sorbent which reduces interfering compounds in the MSPD extracts. The proposed conditions have been applied to dried marine sediments, as example of abrasive samples. The utility of the proposed approach to clean other sorbents typically used in MSPD has been also evaluated.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. A PAH calibration MIX containing the 16 PAHs recognized as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). This mixture contained the compounds listed in Table 1, 10 µg/mL each compound in acetonitrile, and acenaphthylene (the later compound was not included in the present study because it could not be detected by fluorescence). Working solutions of the tested PAHs (100 ng/mL each) were prepared by dilution of the stock solutions with acetonitrile. These solutions were stable for at least one month. All solutions were stored in the dark at 4 °C.

Bondesil C₁₈ phases (40 µm) were obtained from Varian (Harbor City, CA, USA) and from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). Florisil (60–100 mesh) and silica gel (70–230 mesh) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany).

Acetonitrile was of HPLC grade (Romil, Cambridge, UK). Methanol and acetone were obtained from Teknokroma (Barcelona, Spain). Tetrahydrofuran (THF) stabilized with 250 ppm of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain) and *n*-hexane was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Water was deionised and filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma).

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a high-pressure six-port injection valve (Rheodyne Model 7000) and a programmable fluorimetric detector (Hewlett-Packard, 1046 Series). The detector was linked to a data system (Hewlett-Packard, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation.

For IT-SPME the stainless steel loop of the injection valve was replaced by a TBR-35 capillary column (70 cm length × 0.32 mm i.d., 3-µm film thickness) obtained from Teknokroma. Capillary connections to valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing; 1/16 in. PEEK nuts and ferrules were used to complete the connections. Aliquots of 3.0 mL of the working solutions were manually loaded into the extractive capillary column by means of a 1.0-mL precision syringe. Next, 100 µL of water were flushed in order to eliminate the solution remaining into the capillary. Finally, the valve was manually rotated, so the analytes were desorbed from the extractive phase of the capillary with the mobile-phase, and transferred to the analytical column for separation and detection [6].

For separation of the PAHs a LiChrospher PAH, 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm (Merck, Darmstadt, Germany) column was used. The initial composition of the mobile phase was water-methanol-acetonitrile 20:55:25 (v/v/v). This composition was kept constant until 8 min, and then, the acetonitrile content was increased to reach 100% at 16 min; 100% acetonitrile was the mobile-phase from 16 min until the end of the chromatographic run. The mobile-phase flow rate was 0.8 mL/min in the 0–8 min time interval, and then it was linearly increased up to 1.5 mL/min at 16 min; the mobile-phase flow rate was then kept constant until the end of the run (24 min). At the end of the run the flow rate and mobile-phase composition were linearly returned to the original values in 2 min. These conditions were maintained for 3 min before injecting the next sample. The solvents were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma) and degassed with helium before use.

Table 1
Detection conditions and times of retention of the tested PAHs.

Compound	Time of retention (min)	Excitation/emission wavelengths (nm)			
		265/335	265/375	265/425	265/475
Naphthalene	5.6	X			
Acenaphthene	8.4	X			
Fluorene	9.1	X			
Phenanthrene	10.4		X		
Anthracene	12.0		X	X	
Fluoranthene	13.1			X	X
Pyrene	13.9		X	X ^a	
Benzo[a]anthracene	15.8		X ^a	X	
Chrysene	16.3		X	X ^a	
Benzo[b]fluoranthene	17.7			X	X
Benzo[k]fluoranthene	18.4			X	X ^a
Benzo[a]pyrene	19.3			X	X ^a
Dibenz[a,h]anthracene	20.7			X	
Benzo[g,h,i]perylene	21.9			X	X ^a
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	22.8				X

^a Alternative detection conditions.

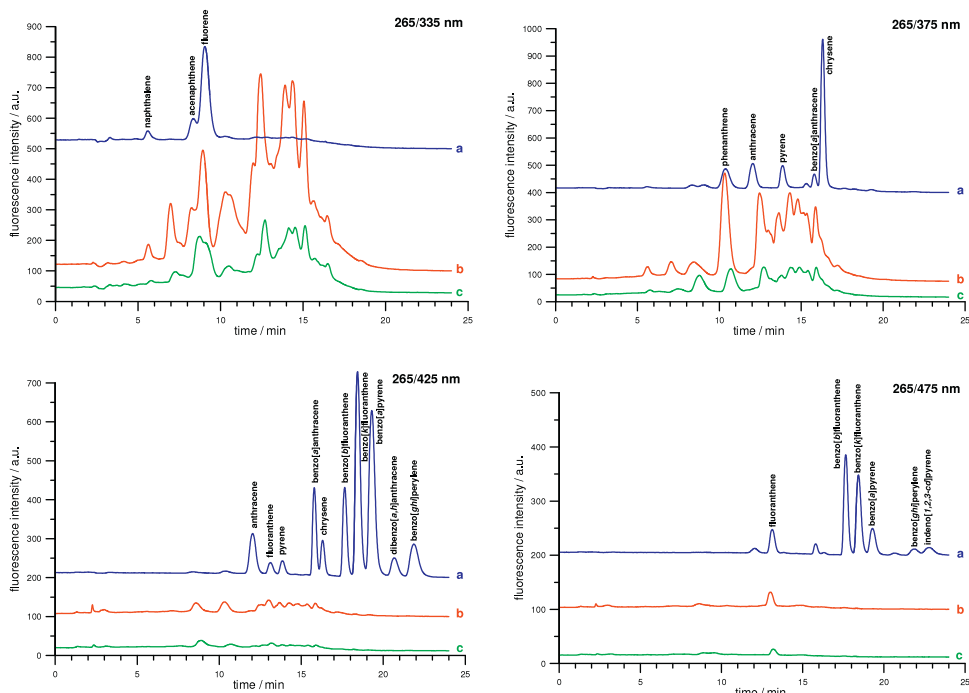


Fig. 1. Chromatograms obtained at the working excitation/emission wavelengths for (a) a standard solution of the tested PAHs at a concentration of 0.58 ng/mL; and the extracts collected after grinding 400 mg of (b) untreated C_{18} phase, and (c) C_{18} phase prewashed with 1.0 mL of acetonitrile. For other details, see text.

The detector was programmed to measure the fluorescence intensity at an excitation wavelength of 265 nm and emission wavelengths of 335, 375, 425 and 475 nm, with a gain value of 17 over a maximum of 18. In Table 1 are listed the detection conditions used for each of the tested PAHs, as well as the retention times obtained under the chromatographic conditions used.

An ultrasonic bath (300 W, 40 kHz, Sonitech, Guarnizo, Spain) was employed for the sonication of the phases.

2.3. MSPD conditions

The MSPD procedure was adapted from that optimized previously for the determination of PAHs in biota microsamples [6]. Portions of 100 mg of the samples (marine sediments) were placed in a glass mortar and ground with a pestle with 400 mg of the C_{18} phase for 5 min (in studies aimed at evaluating the presence of sorbent contaminants, only portions of 400 mg of the sorbent were processed). The resulting powder was then transferred to a 3 mL polypropylene SPE tube (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a polyethylene frit (20 μ m, Supelco) placed at the bottom. Another frit was then placed at the top of the tube with the aid of a syringe plunger. To desorb the analytes, the cartridge was flushed with 1.2 mL of acetonitrile by applying positive pressure, and the extracts were collected into glass vials. Finally, 2.6 mL of water were added to the extracts, and 3.0 mL of the resulting mixture were introduced into the capillary extractive column. The addition of water to the acetonitrile extracts was necessary for the analytes to be retained

into the capillary coating [6]. Finally, the capillary was flushed with 100 μ L of water, and the valve was rotated, so the analytes were sent to the analytical column.

2.4. Sorbent treatment

Two different approaches were evaluated in order to eliminate impurities that could interfere with the tested PAHs, prior washing and ultrasonic assisted extraction followed by sorbent washing. Prior washing was accomplished by introducing 400 mg of the sorbent into a pre-fitted SPE tube. Then, an aliquot of the washing solvent was flushed through the tube by applying vacuum. After washing, the sorbent was transferred to a glass mortar for MSPD. In assays involving ultrasonic assisted extraction, the sorbent was transferred to a pre-fitted SPE tube, and the tube was rinsed with 1 mL (unless otherwise stated) of solvent. Once the solvent reached the exit, the tube was plugged with a PVC cap and introduced into an ultrasonic bath until the level of water in the bath was above the extraction solvent level inside the tube. Then, ultrasonication was applied for a defined period of time. After ultrasonication, the PVC cap was removed and extraction solvent was flushed out by vacuum, and then the sorbent was washed with the same or a different solvent. Finally, the sorbent was dried with air and transferred to a glass mortar for MSPD. Different extraction solvents and sonication times were assayed.

All the experiments were carried out in duplicate and at room temperature.

3. Results and discussion

3.1. MSPD with untreated C_{18} sorbent

In a previous set of experiments we evaluated the possibility of using untreated C_{18} sorbent for processing the samples. For this purpose 400 mg of sorbent were placed in a glass mortar and gently ground for 5 min. Then, the sorbent was transferred to an extraction tube, and an aliquot of 1.2 mL of acetonitrile was passed through the tube. The extract was collected into a clean vial (the final volume collected in the vial was about 0.8 mL), and then, 2.6 mL of water were added to the extracts. Finally, 3.0 mL of the resulting mixture were introduced into the IT-SPME device and chromatographed.

In Fig. 1 are depicted the chromatograms obtained at the four working pairs of excitation/emission wavelengths. These chromatograms revealed the presence of several compounds in the collected extracts. Most of these compounds eluted between 5 and 18 min and exhibit more intense responses at excitation/emission wavelengths 265/235 nm and 265/375 nm, whereas at the other two pairs of wavelength relatively clean background chromatograms were observed.

Fig. 1 also shows the chromatograms obtained for a solution prepared by spiking a mixture of acetonitrile (0.8 mL) and water (2.6 mL) with 20 μ L of a standard solution of the PAHs (100 ng/mL in each compound). Therefore, the concentration of each PAHs in this solution was 0.58 ng/mL. It should be indicated that, assuming a quantitative recovery of the analytes in the MSPD, this concentration value would correspond to a concentration of each PAH in a hypothetical solid sample (100 mg) of 20 ng/g. Concentrations of PAHs in the low ng/g levels can be expected in marine sediments [18].

A high concordance was observed between the retention times of some PAHs and some of the peaks observed in the chromatograms obtained when processing the sorbent. This is the case of naphthalene, acenaphthene, fluorene, fluoranthene and phenanthrene. There is also a good concordance between the peak height ratios measured at two different pairs of wavelengths, and the ratios observed for the PAHs eluting at the same retention times. For example, the peak height ratio measured at 265/475 nm and 265/425 nm in the sorbent extract for the peak eluting at the retention time of fluoranthene (13.1 min) was (1.54 ± 0.07) , whereas the ratio measured for this compound in the standard solution was (1.55 ± 0.05) ($n = 3$). These results suggest that the peaks observed in the background chromatograms most probably correspond to the aforementioned PAHs, which is in agreement with previously reported results [16]. In some instances the intensity of the peak in the chromatograms of the sorbent is much higher than that of the standard solution. For example, at optimum conditions for detecting phenanthrene (265/375 nm) the peak height of the suspected phenanthrene in the chromatograms obtained for the sorbent is about five times higher than that of the standard solution. In other words, the direct use of C_{18} sorbent would introduce a clear over-estimation of this compound if it is present in the samples at ng/g levels.

There are also some interfering peaks at retention times similar to other PAHs such as anthracene ($t_r = 12.0$ min) at 265/375. However, no peak at this time was observed at 265/425 nm which indicates that the peak observed in the chromatograms of the sorbent extract at 265/275 nm did not correspond to anthracene. This PAH can be quantified at 265/425 nm with negligible interference. Interferences can be minimized for some compounds by working at suboptimal detection conditions. For example, optimal conditions for detecting pyrene are 265/375 nm, but a substantial interference due to the background peaks eluted at its retention time ($t_r = 13.9$ min) can be expected. The background signal at such

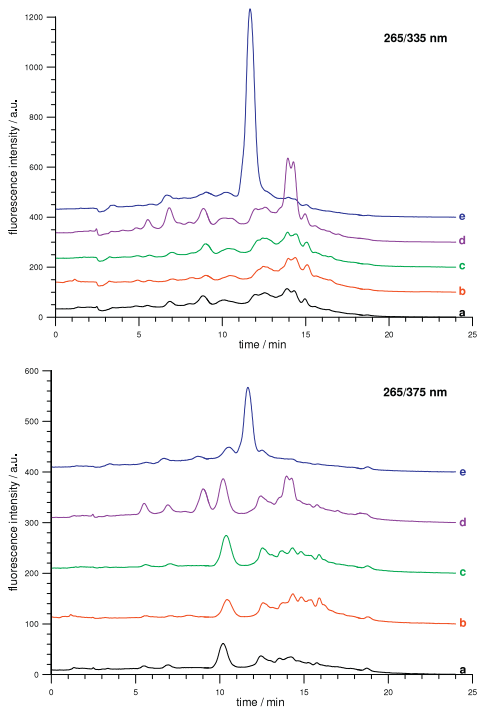


Fig. 2. Chromatograms at 265/335 nm and 265/375 nm of the extracts collected after grinding of 400 mg of C_{18} phase after sonication with (a) acetone, (b) methanol, (c) acetonitrile, (d) *n*-hexane and (e) THF. For other details, see text.

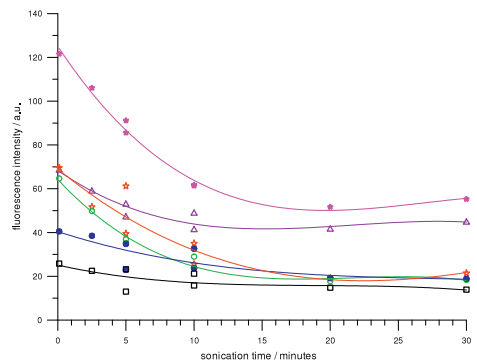


Fig. 3. Effect of the sonication time on the background chromatograms obtained from C_{18} conditioned by ultrasonic assisted extraction with acetone. Signals measured at retention times and optimum excitation/emission wavelengths for some of the tested PAHs (see Table 1): (Δ) naphthalene, (\bullet) fluorene, (\star) phenanthrene, (\square) anthracene, (\bullet) pyrene, (\square) benzo[a]anthracene. For other details, see text.

elution times is much lower at 265/425 nm, although the signal of the analyte is also lower.

There is also a concordance between the retention times of some of the peaks of the sorbent extracts and the retention times of some PAHs. For example, intense peaks at observed at 265/375 nm at the retention time of benzo[a]anthracene ($t_r = 15.8$ min), but at the optimal detection conditions for this compound (265/425 nm) the interfering peak is negligible.

The above results indicated that untreated C_{18} sorbent cannot be applied for quantifying PAHs at low ng/g levels, because of the direct interference caused by the presence of traces of some PAHs and other impurities in the sorbent. For some of the tested PAHs, the interference caused by other impurities can be eliminated or reduced, but sometime at expense of the sensitivity.

As stated earlier, many MSPD procedures incorporate additional steps to remove co-extracted compounds. In the present application, the incorporation of extra cleaning to purify the MSPD extracts would fail, as in some cases analyte and coeluting interferent are the same. Therefore, cleaning of the sorbent before blending it with the sample is necessary.

3.2. Prior washing of the sorbent

A prior washing of the sorbent with an organic solvent or mixture of solvents is the most common treatment in MSPD, and several examples can be found using solvents such as acetonitrile, hexane or acetone, among others. In the present study we tested

different solvents for eliminating sorbent impurities before the grinding step. For this purpose, 400 mg of the sorbent were placed in pre-fritted extraction tubes, and variable volumes (0.5–3.0 mL) of acetonitrile, acetone, THF, methanol and *n*-hexane were passed through the cartridges. After drying with air, 1.2 mL of acetonitrile was passed through the tubes, and the extracts collected were processed as described earlier. The chromatograms obtained were relatively clean, and most peaks found for untreated sorbents in Fig. 1 were not detected (data not shown).

In another set of experiments, the sorbent was placed into a glass mortar after the washing step, and then ground for 5 min. After grinding, the sorbent was transferred to a SPE tube. Aliquots of 1.2 mL of acetonitrile were flushed through the tube, and the collected extracts were processed as usual. Unlike the extracts obtained without the grinding step, many peaks were observed in the resulting chromatograms. For all tested solvents the chromatographic profiles were similar, and most peaks observed with the untreated sorbent were detected including the peaks of the suspected PAHs, although their intensity was substantially decreased. As an example, in Fig. 1 are also depicted the chromatograms obtained when washing the sorbent with 1.0 mL of acetonitrile (the employment of larger volume resulted in little improvement). On the other hand, the most intense interfering peaks were observed with all tested solvents, and thus, a sequential wash with different solvents did not significantly improve the results (data not shown).

The comparison of the chromatograms obtained with and without grinding suggested that the prior washing eliminates the

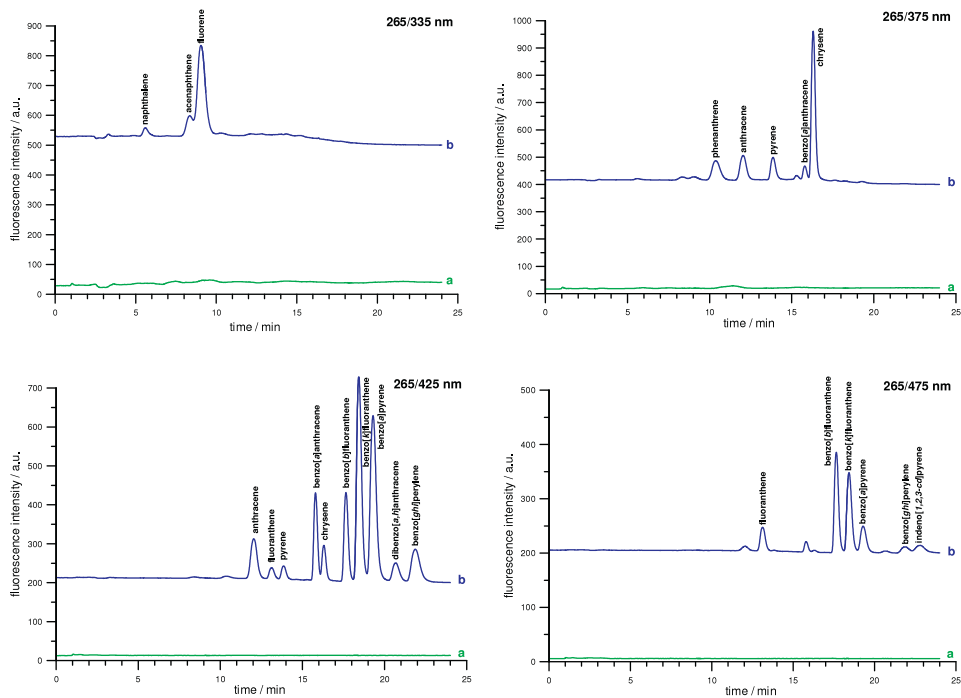


Fig. 4. Chromatograms obtained at the working excitation/emission wavelengths for: (a) the extracts collected after cleaning the sorbent with the proposed procedure, and (b) a standard solution of the tested PAHs (0.58 ng/mL of each compound). For other details, see text.

Table 2

Effect of the volume of solvent on the background chromatograms obtained from C_{18} conditioned by ultrasonic assisted extraction with acetone. Signals measured at retention times and optimum excitation/emission wavelengths for some of the tested PAHs. For other details, see text.

Analyte	Background signal		
	0.5 mL	1 mL	2 mL
Naphthalene	70.0	47.0	46.0
Fluorene	119.1	61.4	62.5
Phenanthrene	51.7	20.9	25.2
Anthracene	52.4	18.4	22.2
Pyrene	40.3	25.7	29.4
Benzo[a]anthracene	21.7	19.3	20.2

impurities from the surface of the sorbent, but the grinding step may break solid particles releasing additional amounts of contaminants [19]. According to the literature, prior washing of the sorbent may be adequate for quantifying PAHs at $\mu\text{g/g}$ levels [6,16,17] but, as deduced from Fig. 1, this treatment is still insufficient if samples containing lower concentration of the analytes are going to be analysed.

3.3. Ultrasonic assisted extraction

In order to facilitate the removal of impurities from the sorbent, ultrasonic assisted extraction was tried. MSPD combined with ultrasonication has been recently introduced as an alternative to increase the efficiency of the extraction of different analytes and matrices [20–22]. However, to the best of our knowledge, ultrasonication has not been applied to purify MSPD sorbents. In this study, portions of the sorbent (400 mg) were introduced into pre-fritted tubes, and the tube was rinsed with variable volumes of an organic solvent and placed in an ultrasonic bath at room temperature. After sonication for a defined period of time, the extraction solvent was removed by vacuum, and the sorbent was washed with the same solvent. This step can be repeated with a different solvent. The sorbent was then dried with air and placed into a glass mortar and then ground for 5 min. After grinding, the sorbent was transferred to a SPE tube and aliquots of 1.2 mL of acetonitrile were flushed through the tubes. The collected extracts were processed as described earlier.

The chromatograms obtained revealed that the combination of ultrasonic extraction and washing is much more effective in removing sorbent impurities. This is illustrated in Fig. 2, which shows the chromatograms obtained with the solvents tested at the two pairs of wavelengths more problematic (265/335 nm, and 265/375 nm). Acetone, THF and methanol provided quite similar results, although when using THF the peak height of the compound eluting at the retention time of fluoranthene ($t_r = 13.1$ min, 265/475 nm) was substantially reduced. THF was considered the best solvent to eliminate sorbent impurities. However, when using THF an additional peak was observed at 11.8 min, which can be attributed to the presence of an additive in this solvent, and interferes the determination of anthracene.

Parameters such as the volume of organic solvent used in washing step and the sonication time were optimized. In Table 2 are shown the peak heights measured in the background chromatograms at the retention times of some PAHs and their respective excitation/emission wavelengths (see Table 1) when using acetone as extractive solvent. According to these data, a volume of 1.0 mL of acetone was enough to remove a major portion of impurities released from the sorbent by ultrasonication. As regards the time of sonication, the intensity of the background chromatograms was found to decrease in the 1–10 min interval as depicted in Fig. 3. Extending the sonication time did not improve

the chromatograms. Similar tendency was observed with the other solvents tested.

A further improvement of the background chromatogram was achieved by incorporating an additional ultrasonic assisted extraction. Different combinations of solvents were tested, and the best results were obtained by using THF in the first extraction step, followed by the extraction with acetone. As stated above, THF provided the cleanest extracts, whereas the employment of acetone in the second extraction reduced the background chromatograms and allowed the elimination of the peak of THF additive. Therefore, the final procedure proposed for conditioning of the sorbent can be summarized as follows: (1) rinse the tube with 1 mL of THF and cap, introduce the tube into the ultrasonic bath for 10 min, and then remove and wash the sorbent with 1 mL of acetone; (2) rinse the tube with 1 mL of acetone and cap, introduce the tube into the ultrasonic bath for other 10 min, and then, remove and wash the sorbent with 1 mL of acetone; and (3) transfer the sorbent to a mortar for MSPD.

Examples of the chromatograms obtained under the proposed conditions are given in Fig. 4. Additionally, the proposed conditions were applied to different batches of C_{18} , being the chromatograms obtained very similar to those shown in Fig. 4.

By comparing Figs. 1 and 4 it can be deduced that with the proposed procedure the impurities of the sorbent were effectively eliminated, and all the tested PAHs could be quantified at their respective optimum detection conditions free from interferences.

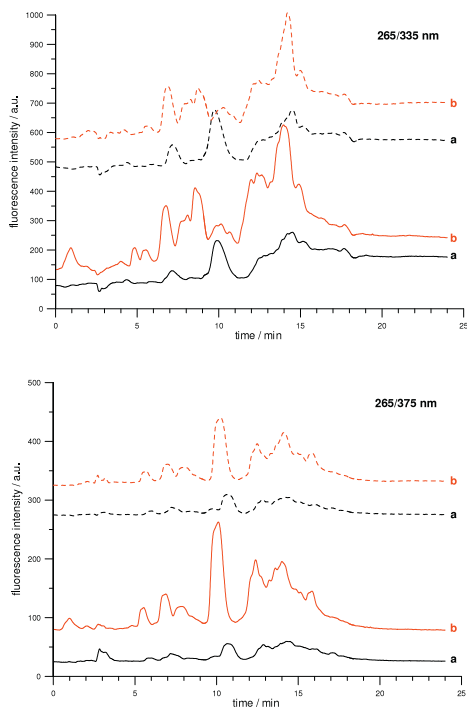


Fig. 5. Chromatograms at 265/335 nm and 265/375 nm of the extracts obtained after grinding silica (solid lines) and Florisil (dashed lines) sorbents (a) after conditioning them with the proposed procedure, and (b) without treatment. For other details, see text.

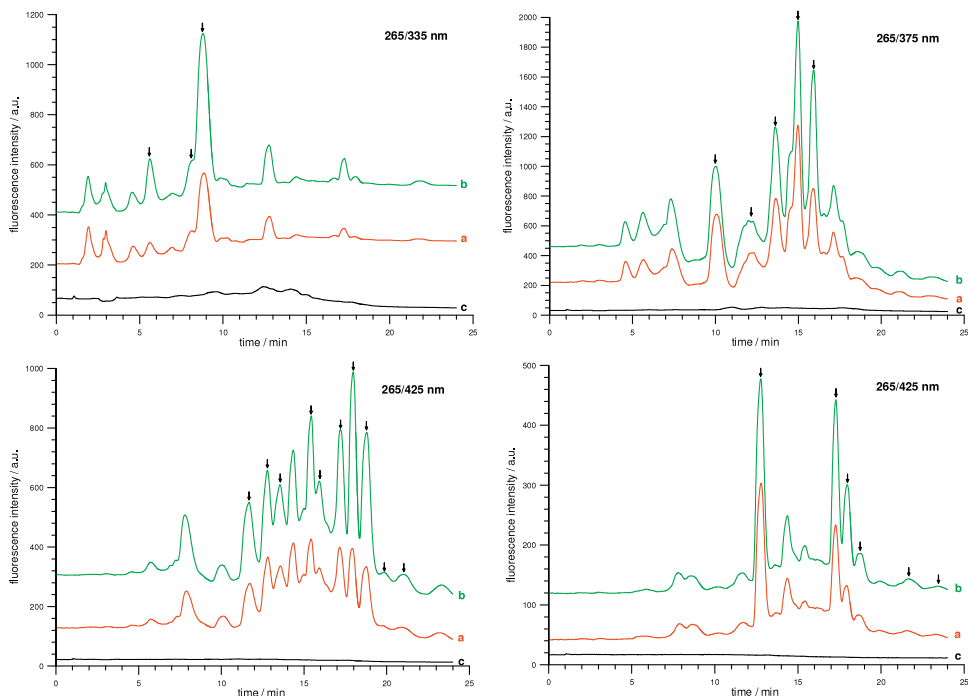


Fig. 6. Chromatograms obtained at the working excitation/emission wavelengths for: (a) real sample (100 mg of marine sediment) and (b) the same sample spiked with the tested PAHs (20 ng/mg of each compound), both obtained with C_{18} sorbent cleaned with the proposed procedure; the figure also shows the chromatograms obtained under the same conditions without sample (c). Peaks corresponding to the tested PAHs are marked with an arrow. For other details, see text.

It should be remarked that in MSPD procedures involving ultrasonication not only would increase analyte recoveries but also the amount of sorbent impurities in the collected extracts. This can be an explanation for the unacceptable high recoveries reported by ultrasonic-assisted MSPD procedures [11,19], which are generally attributed to matrix components.

3.4. Utility of the proposed procedure

3.4.1. Application to other sorbents

The proposed cleaning procedure was applied to other sorbents typically used in MSPD such as silica and Florisil. These sorbents have also been proposed for the analysis of PAHs by MSPD [13,15,16]. The results were compared with those obtained when grinding directly the untreated sorbents.

The chromatograms of the extracts collected from the untreated phases showed several peaks, many of which may interfere with the analytes. As for the chromatograms obtained for untreated C_{18} sorbent, the coincidence on retention times and fluorescence signals at different pair of wavelengths confirmed the presence of some PAHs such as naphthalene or fluorene in the sorbents. Nevertheless, the chromatograms profiles were different to those observed with the C_{18} sorbent, which suggested the presence of other types of contaminants.

When applying the proposed cleaning approach to those sorbents, the intensity of interfering peaks was also drastically

reduced. As an example, Fig. 5 shows the chromatograms obtained at two pairs of wavelengths before and after applying the proposed cleaning procedure. Similar results were observed at the other working pairs of wavelengths (data not shown). It was therefore concluded that the proposed conditions are effective not only for C_{18} but also for other classes of sorbents typically used in MSPD.

3.4.2. Application to real samples

Marine sediments were selected as representative real samples for application of the proposed procedure. Since dried marine sediments are more abrasive than other solid samples such as food or biota, higher contamination of the samples during grinding can be expected. Portions of C_{18} sorbent conditioned with the proposed procedure were used. In Fig. 6a are shown the chromatograms of one of the samples analysed, which contained the tested PAHs at ng/g. This figure also shows the chromatograms obtained for the same sample after adding 20 ng/g of each of the tested PAHs (Fig. 6b). The background chromatograms obtained by applying the same conditions but in absence of sample (Fig. 6c) confirmed that peaks detected in the samples were not due to sorbent impurities.

The proposed procedure allowed the direct processing of MSPD extracts by IT-SPME and LC with fluorescence, being the selectivity and sensitivity suitable for the estimation of PAHs at ng/g levels. To our knowledge, this is the only procedure described for the determination of PAHs at these concentration levels which avoids

tedious and time consuming operations aimed at concentrating or purifying the MSPD extracts.

4. Conclusions

This study has shown that the presence of impurities in the sorbents is a serious limitation for the quantification of PAHs in MSPD-based procedures. The inclusion into the final procedure of purification of the extracts collected after MSPD may be inadequate because some PAHs are common impurities of sorbents typically used in MSPD. Therefore, a previous cleanup of the sorbent is necessary. In this sense, a simple washing of the sorbent with an organic solvent (or mixture of solvents) may be insufficient, especially when the expected concentrations of PAHs in the sample are in the low ng/g range.

Ultrasonication of the sorbent in the presence of an organic solvent facilitates the release of sorbent impurities. In the present instance, a double ultrasonic assisted extraction with THF and acetone was found to remove impurities of C₁₈ sorbents that would otherwise be released during the grinding step. The proposed cleaning procedure allows the direct processing of MSPD extracts by IT-SPME and LC with fluorescence, being the selectivity and sensitivity suitable for the estimation of PAHs at ng/g levels. The proposed procedure is simple and rapid (different sorbent portions can be treated simultaneously), and the consumption of organic solvents is reduced to a minimum. The described approach has been developed with C₁₈ sorbents, but it is also effective for removing impurities of silica and Florisil phases.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad for the financial support received (project

CTQ 2011-26760) and Generalitat Valenciana, project "Application of EU Water Framework Directive 2000/60/EC on endocrine disrupters and other priority substances in coastal areas in the Region of Valencia". Y.M.M. expresses her gratitude for a JdC research contract (Ministerio de Ciencia e Innovación). R.A. G.F. expresses his gratitude for a "Atracció de Talents" grant (Universitat de València).

References

- [1] S.A. Barker, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 151.
- [2] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 963.
- [3] L. Ramos, J. Chromatogr. A 1221 (2012) 84.
- [4] E.M. Kirstenson, L. Ramos, U.A.Th. Brinkman, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 96.
- [5] F. Rezaei, M.-R.M. Hosseini, Anal. Chim. Acta 702 (2011) 274.
- [6] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, J. Chromatogr. A 1211 (2008) 13.
- [7] M.D. Crouch, S.A. Barker, J. Chromatogr. A 774 (1997) 287.
- [8] S.A. Berker, J. Chromatogr. A 880 (2000) 63.
- [9] A.L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2521.
- [10] M. Míguez-Framil, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, I. Álvarez-Freire, M.J. Tabernero, A.M. Bermejo, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6342.
- [11] Q. Liu, J. Shi, J. Sun, T. Wang, L. Zeng, N. Zhu, G. Jiang, Anal. Chim. Acta 708 (2011) 61.
- [12] T. Wang, J. Tong, M. Sun, L. Chen, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1886.
- [13] M.J. Bogusz, S.A. El Hajj, Z. Ehaideb, H. Hassan, M. Al-Tufail, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 1.
- [14] L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 103.
- [15] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, J. Chromatogr. A 1148 (2007) 219.
- [16] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1165 (2007) 32.
- [17] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 155.
- [18] D.R. Banjoo, P.K. Nelson, J. Chromatogr. A 1066 (2005) 9.
- [19] A. Kruve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, J. Chromatogr. A 1187 (2008) 58.
- [20] J.J. Ramos, R. Rial-Otero, L. Ramos, J.L. Capelo, J. Chromatogr. A 1212 (2008) 145.
- [21] A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, Anal. Chim. Acta 641 (2009) 117.
- [22] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, J. Sep. Sci. 33 (2010) 2862.

Anexo 2.

Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds.

Moliner-Martínez, Y., Vitta, Y., Prima-García, H., González-Fuenzalida, R. A., Ribera, A., Campins-Falcó, P., Coronado, E.

Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds

Y. Moliner-Martínez · Yosmery Vitta ·
Helena Prima-García · R. A. González-Fuenzalida ·
Antonio Ribera · P. Campíns-Falcó · Eugenio Coronado

Received: 10 June 2013 / Revised: 27 August 2013 / Accepted: 16 September 2013 / Published online: 9 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract This work demonstrates the application of silica supported Fe₃O₄ nanoparticles as sorbent phase for magnetic solid-phase extraction (MSPE) and magnetic on-line in-tube solid-phase microextraction (Magnetic-IT-SPME) combined with capillary liquid chromatography–diode array detection (CapLC-DAD) to determine organophosphorous compounds (OPs) at trace level. In MSPE, magnetism is used as separation tool while in Magnetic-IT-SPME, the application of an external magnetic field gave rise to a significant improvement of the adsorption of OPs on the sorbent phase. Extraction efficiency, analysis time, reproducibility and sensitivity have been compared. This work showed that Magnetic-IT-SPME can be extended to OPs with successful results in terms of simplicity, speed, extraction efficiency and limit of detection. Finally,

wastewater samples were analysed to determine OPs at nanograms per litre.

Keywords Magnetic nanoparticles · Organophosphorous pesticides · Magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction

Introduction

Hybrid magnetic nanoparticles (NPs) have been widely used to develop new (micro)extraction techniques. In this context, most applications are based on their use for magnetic solid-phase extraction (MSPE) or dispersive (micro)solid-phase extraction (D-(μ)SPE). These adsorbents exhibit superparamagnetic behaviour that makes them especially attractive for MSPE because they can be concentrated and separated from solutions easily at low magnetic field gradients [1, 2]. These methods, however, require several sample pretreatment steps. In this respect, in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) can overcome this limitation as it facilitates sample processing, especially in hyphenated liquid chromatography (LC) techniques. Nevertheless, the main drawback of IT-SPME is the poor extraction capacity. Recently, we reported the use of silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs) as sorbent phase for IT-SPME (Magnetic-IT-SPME) [3]. In this approach, a magnetic hybrid material was immobilized on the surface of a bare fused silica capillary column and utilized as injection loop providing quantitative extraction efficiencies for pharmaceutical emerging pollutants.

Herein, the objective of this work has been to study the adsorption of organophosphorous compounds (OPs) on a silica supported Fe₃O₄ NPs sorbent material. This knowledge

Published in the topical collection *Microextraction Techniques* with guest editors Miguel Valcárcel Cases, Soledad Cárdenas Aranzana and Rafael Lucena Rodríguez.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-013-7379-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Moliner-Martínez · R. A. González-Fuenzalida ·
P. Campíns-Falcó (✉)
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química,
Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia,
Spain
e-mail: pilar.campins@uv.es

Y. Vitta
School of Chemistry, Faculty of Science, Central University of
Venezuela Paseo los Ilustres, Urb. Valle Abajo, 20513 Carracas,
Venezuela

H. Prima-García · A. Ribera · E. Coronado
Instituto de Ciencia Molecular (ICMol), Universidad de Valencia,
Catedrático José Beltrán 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

has been used to develop MSPE and Magnetic IT-SPME extraction procedures. Additionally, the hybrid material has also been proved useful for IT-SPME, increasing the number of existing adsorbent phases for this technique. Chlorfenvinphos and chlorpyrifos (OPs) are widely used pesticides. The European Directive 2008/105/EC includes those compounds as priority pollutants due to their hazardous nature, persistence and water solubility and gives environmental quality standards for both OPs [4]. The results showed the potential application of Magnetic-IT-SPME for these pollutants. The paper is mainly focused for improving on-line IT-SPME in two ways: introducing new phases and searching new interactions in order to achieve better extraction efficiencies.

Experimental section

MSPE procedure

Fifty milligrams of magnetic sorbent material was added to 20 mL of standards or water samples. After stirring during 10 min, the sorbent was isolated from the solution with a Nd disk magnet. The sorbent was air-dried to eliminate the excess water (30 s). Subsequently, the analytes were extracted with 500 μ L of methanol and isolated with the magnet. Then, 1 mL of water was added and the extracts were processed (see [Electronic supplementary material](#)).

Magnetic-IT-SPME procedure

Magnetic-IT-SPME was carried out by the approach developed in our group [3] (see [Electronic supplementary material](#)). Aliquots of 3 mL of the standards or samples were directly loaded into the magnetic capillary column at 10 μ L/s using a syringe at different magnetic fields (B). The schematic diagram of the system is shown in Fig. S1 ([Electronic supplementary material](#)). The analytes were desorbed from the capillary column combining the mobile phase and the change of magnetic field polarity. Finally, the analytes were separated in the analytical column. After each injection, the capillary column was cleaned with 300 μ L of methanol.

Water samples

Wastewater samples (effluents) were collected at different water treatment plants of the Comunidad Valenciana. Samples were directly analysed. After the arrival to the laboratory, water samples were stored in dark in brown glass flasks at 4 °C until analysis. Each sample was analysed in triplicate and at room temperature. External calibration was used for quantitation.

Results and discussion

Adsorption isotherms

The magnetic hybrid material is a highly porous network formed by Fe_3O_4 -cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) micelles and surfactant micelles embedded along the silica matrix (see Fig. S2a, [Electronic supplementary material](#)) providing the hydrophobic sorbent material [5]. Besides, the calculated atomic spin flip time (τ_0) demonstrated that the NPs are non-interacting (data not shown). Additionally, Fe_3O_4 NPs along the silica matrix are well dispersed, isolated and susceptible to small magnetic fields [3].

Langmuir and Freundlich adsorption isotherms were examined to illustrate the nature of the interaction between the hybrid material and the OPs. The correlation coefficients (R^2) (see Table S1, [Electronic supplementary material](#)) indicated that the adsorption can be better demonstrated by the Langmuir isotherm compared to the Freundlich model. This result suggested that the analytes were adsorbed on the homogeneous adsorption sites that CTAB micelles created in the hybrid material. This phenomenon is supported by the previously reported results where the adsorption properties were mainly due to hydrophobic interactions between the alkyl chain of CTAB micelles and the analytes.

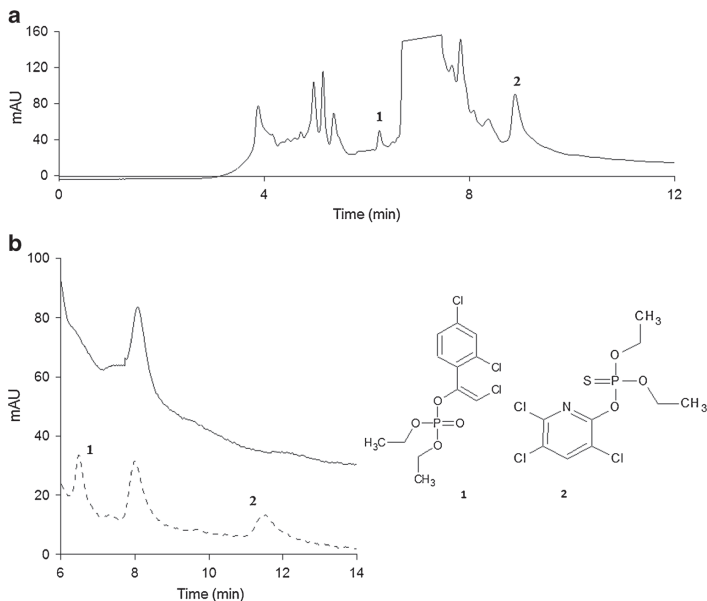
MSPE procedure

To test the performance of the hybrid material in the determination of OPs, the following extraction conditions: amount of sorbent, volume of sample, contact time and elution solvent were first optimized at 50 mg, 20 mL, 60 min and 500 μ L of methanol, respectively (see Fig. S3, [Electronic supplementary material](#)). Finally, 1 mL of water was added to the methanolic extracts (500 μ L) and processed (see [Electronic supplementary material](#)). The absolute extraction efficiencies for chlorfenvinphos and chlorpyrifos were 92 ± 4 and 97 ± 3 %, respectively. Figure 1a illustrates the chromatogram obtained for a mixture of OPs. As can be seen, other compounds present in water were also eluted under the experimental conditions. Nevertheless, they did not interfere in the determination of OPs.

The viability of the use of the hybrid material for OP detoxification of waters was also investigated. Detoxification efficiency was determined as a function of the concentration in the supernatant (see [Electronic supplementary material](#) for further details). The results after the removal procedure demonstrated good removal efficiencies: 95 ± 5 and 100 ± 6 % for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively. Figure 1b shows the chromatogram obtained for a spiked water sample before and after the detoxification procedure.

In this context, the stability of the sorbent material was studied (see Fig. S4, [Electronic supplementary material](#)). The

Fig. 1 **a** Chromatogram obtained for a mixture of chlorfenvinphos and chlorpyrifos ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) using MSPE procedure. **b** Chromatogram obtained for a spiked wastewater sample (3 and $4 \mu\text{g L}^{-1}$ for (1) chlorfenvinphos and (2) chlorpyrifos, respectively) before (dashed line) and after (solid line) the removal procedure



Fe/Si ratio remained constant; thus, Fe leaching was negligible in 40 uses. Nevertheless, the Br/Si ratio decreased in 20 uses. Besides, the percent adsorption of the analytes remained constant after 20 uses. These results indicated that Fe₃O₄-CTAB and CTAB micelles are structural units of the sorbent material and leaching was negligible providing clean extracts when the number of uses was below 20. Therefore, the hybrid material is a suitable, magnetically separable adsorbent to remove OP pollutants at trace level.

Magnetic-IT-SPME procedure

An improved approach of the silica supported Fe₃O₄ NPs is the immobilization as adsorbent phase on the bare surface of a capillary column (see Fig. S2b, Electronic supplementary material). In this approach, a mixture of the target analytes was processed and the extraction efficiency was evaluated as a function of B . The results for both analytes are presented in Fig. 2. Both analytes showed a similar tendency with a maximum in $B=200$ G, giving rise to absolute extraction efficiencies of 60 ± 3 and 84 ± 5 % for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively.

The study of the extraction efficiency if $B=0$ G provided values of 33 ± 2 and 64 ± 3 % for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively. Besides, the absolute extraction efficiencies obtained with existing sorbent phases such as polymer polydimethylsiloxane (PDMS) (TRB5) were estimated in the range of 25–29 % for both analytes. Therefore, the hybrid

material improved the extraction efficiency of OPs when this capillary column was used as injection loop in a conventional IT-SPME (without a B). Alternatively, a significant improvement of the extraction efficiencies was achieved if an external B is applied. In the first case, hydrophobic interactions governed the adsorption capacity of the target analytes. Meanwhile, in the Magnetic IT-SPME approach, the extraction efficiency is improved by combining the hydrophobic interactions and the magnetic forces generated by the nanomagnets.

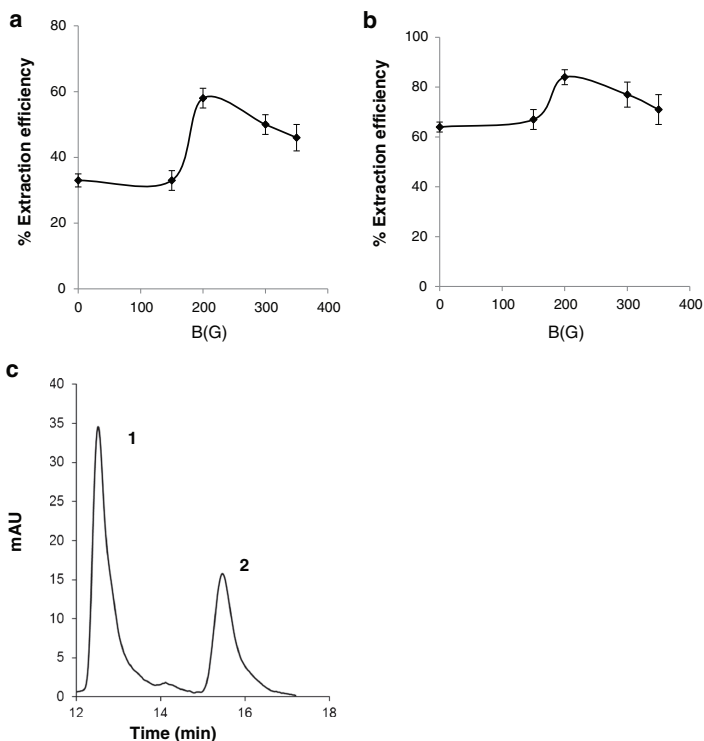
The processed sample volume was also optimized (see Fig. S5, Electronic supplementary material). The high processed volumes suggested a strong interaction between the analytes and the adsorbent phase, which agreed with the results obtained when $B=0$ G. The chromatogram obtained for a mixture of chlorfenvinphos and chlorpyrifos is depicted in Fig. 2c. Notice that the pretreatment step is fully automated with this approach.

Analytical performance

Table 1 shows the analytical parameters obtained for both procedures. Good linearity was obtained and precision (percent RSD) was also suitable.

Limits of detection (LODs) for chlorfenvinphos and chlorpyrifos with the MSPE–capillary LC–diode array detection (MSPE–CapLC–DAD) were 100 and 50 ng L^{-1} , respectively. Note that these values allow the use of this procedure to control the contamination of water with OPs (maximum

Fig. 2 Extraction efficiency (percent) as a function of the B obtained for **a** $10 \mu\text{g L}^{-1}$ chlorfenvinphos and **b** $3 \mu\text{g L}^{-1}$ chlorpyrifos. Injection $200 \mu\text{L}$, $B_{\text{retention}}=B$ (gauss) and $B_{\text{elution}}=B$ (gauss) (reversed polarity). **c** Chromatograms of a mixture of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ chlorfenvinphos (**1**) and $2 \mu\text{g L}^{-1}$ chlorpyrifos (**2**), $B_{\text{retention}}=200 \text{ G}$ and $B_{\text{elution}}=200 \text{ G}$ (reversed polarity). Injection 3 mL , mobile phase: methanol/water $95:5$ (v/v) $6 \mu\text{L min}^{-1}$



acceptable concentration (MAC) values are 300 and 100 ng L^{-1} for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively). The Magnetic-IT-SPME (see Table 1) approach improved the LODs compared to those achieved with existing sorbent phases such as PDMS for OPs in accordance with the best efficiencies achieved. It should be noted that these experiments were carried out by using a short particulate column as analytical column

(see Electronic supplementary material). The use of a longer particulate column or a monolithic capillary column would even improve the sensitivity of this approach. No further research has been made because the achieved LODs are suitable for testing the European Directive [4].

Table 2 compares the studied extraction procedures. In MSPE, magnetism is used as a separation tool; this possibility

Table 1 Analytical parameters obtained for chlorfenvinphos and chlorpyrifos with MSPE-CapLC-DAD and Magnetic-IT-SPME-CapLC-DAD

Procedure	Analytical parameters						
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD (ng L^{-1})	RSD (%)	
						Intraday ($n=3$)	Interday ($n=6$)
MSPE-CapLC-DAD ^a	Chlorfenvinphos	7 ± 2	4.9 ± 0.2	0.9932	100	5	10
	Chlorpyrifos	-2 ± 10	25 ± 1	0.9910	50	7	13
Magnetic-IT-SPME-CapLC-DAD ^b	Chlorfenvinphos	3 ± 20	90 ± 4	0.9947	50	9	14
	Chlorpyrifos	82 ± 53	500 ± 7	0.9997	10	12	15

a monolithic analytical column, *b* particulate analytical column (for more information, see "Experimental section" and Electronic supplementary material)

Table 2 Comparison of some characteristics of the extraction techniques: MSPE, IT-SPME and Magnetic-IT-SPME using the silica supported Fe₃O₄ NPs as sorbent phase

Magnetism implementation	Sample treatment	Automatization	Analysis time (min)	LOD (ng L ⁻¹)	
				Chlorfenvinphos	Chlorpyrifos
Separation tool	MSPE (this work)	*	20	100	50
	MSPE (reference [4] SI)	*	20	–	290 (LOQ) ^a
	MSPE (reference [5] SI)	*	>30	–	4.3 ^b
Variable in the extraction process	<i>H</i> =0 IT-SPME	****	18	85	15
	<i>H</i> = <i>B</i> Magnetic-IT-SPME	****	18	50	10

SI supplementary information

^a Ten millilitres of sample and GC-MS

^b Eight hundred millilitres of sample, evaporation step (8 mL of acetonitrile) and HPLC-UV

serves to estimate the concentration of target analytes bearing in mind the legislated values. LODs achieved are compared with those provided by other materials proposed in the literature. However, it is limited due to the lack of automatization and sensitivity, whereas the use of the silica supported Fe₃O₄ NP capillary column in IT-SPME is notably more efficient, whether in absence of a magnetic field or when a magnetic field is applied. Particularly attractive is the use of Magnetic-IT-SPME. In this case, the magnetic field is a variable in the adsorption process, showing a significant improvement on the extraction efficiency and sensitivity and with a procedure completely automated.

Application to water samples

The methods were applied to the determination of the target analytes in wastewater samples. Chlorfenvinphos and chlorpyrifos were below LOD in the samples with both procedures. Satisfactory recoveries were obtained for spiked samples with mean values of 94±5 and 97±6 %, for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively.

Conclusions

This work demonstrated the potential of silica supported Fe₃O₄ NPs as adsorbent phase for MSPE and Magnetic-IT-SPME to determine OPs in water samples. The results obtained with MSPE-CapLC-DAD were satisfactory, taking into account the MAC values of these pollutants. Additionally, the adsorbent phase has proved to be useful to remove OP

pollutants in water samples. However, more favourable results were achieved with Magnetic-IT-SPME as a pretreatment step yielding extraction efficiencies of up to 60 and 84 % for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively. This approach provides a potential extraction procedure that avoids the pretreatment step and improves sensitivity in water analysis.

Acknowledgments The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia Innovación (CSD2007-00010), to the Ministerio de Economía y Competitividad (project CTQ2011-26760) and to the Generalidad Valenciana (PROMETEO Program and ACOMP/2013/155). R.A. G.F. expresses his gratitude for the “Atracció de Talents” grant (Universitat de València).

References

1. Yvauz CT, Mayo JT, Yu WW, Prakash A, Falkner JC, Yean S, Cong L, Shipley HJ, Kan A, Tomson M, Natelson D, Colvin VL (2006) Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. *Science* 314:964–967
2. Lopez-Lorente AI, Simonet BM, Valcárcel M (2011) Analytical potential of hybrid nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 399:43–54
3. Moliner-Martínez Y, Prima-García H, Ribera A, Coronado E, Campins-Falco P (2012) Magnetic in-tube solid phase microextraction. *Anal Chem* 84:7233–7240
4. European Parliament (2008) 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. European Parliament, Brussels
5. Moliner-Martínez Y, Ribera A, Coronado E, Campins-Falco P (2011) Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1218:2276–2283

Anexo 2.

Supporting Information

for

Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds.

Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds

Y. Moliner-Martinez, Yosmery Vitta, Helena Prima- Garcia, R.A. González-Fuenzalida, Antonio Ribera, P. Campins-Falco, Eugenio Coronado

Reagents

Iron (III) acetylacetoate (Fe(acac)₃), 1,2-hexadecandiol, oleyamine, oleic acid, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, tetraethylorthosilicate (TEOS), polyethylene glycol (PEG), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecylsulphate (SDS) and phenyl ether were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol and acetonitrile were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Stock standard solutions of chlorfenvinphos and chlorpyrifos (100 mg L⁻¹) were prepared in acetonitrile and stored at 4 °C. Working standard solutions were made by appropriate dilution of the stock standard solutions in water or water:methanol.

Instrument and chromatographic conditions

The capillary chromatographic system used consisted of a LC isocratic capillary pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) and a UV-Vis diode array detector (Agilent, 1200 series) equipped with a 80 nL flow cell.

The extracts of the MSPE were analysed by IT-SPME utilizing a GC open tubular capillary column TRB-5 (35 cm, 0.32 mm i.d) coated with 5% diphenyl-95% polydimethylsiloxane. The capillary column was placed in the high pressure six port valve replacing the injection loop. Capillary connections to valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing; 1/16 in. PEEK nuts and ferrules. Chromatographic separation was carried out with a Onyx Monolith (150 mm x 0.2 mm i.d.) column (Phenomenex, USA). The mobile phase was a mixture of water and acetonitrile 70:30 at $15\mu\text{L min}^{-1}$. Aliquots of 1.5 mL of the extracts were manually loaded into the TRB-5 capillary column followed by 50 μL of water to eliminate the remaining solution. Finally, the analytes were transferred to the analytical column for separation and detection.

The Magnetic-IT-SPME was carried out by replacing the injection loop of the high pressure valve with the $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4$ capillary column (60 cm, 0.075 mm i.d). The capillary column was placed inside the magnetic coil such that the magnetic field (B) could be adjusted by varying the current (Fig.S1). Capillary connections to the valve were facilitated by the use of a 2.5 cm sleeve of 1/32 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing; 1/32 in PEEK nuts and ferrules were used to complete the connections. The analytical column utilized was a Zorbax SB C18 (35 mm x 0.5 mm i.d, 5 μm) column (Agilent), operating with a mobile phase methanol/water 95:5 (v/v) at flow rate 6 $\mu\text{L}/\text{min}$.

The absolute recoveries (extraction efficiencies) were calculated by comparing the amount of analyte extracted, which is the amount of the analyte transferred to the analytical column, with the total amount of analyte passed through the IT-SPME capillaries or contained in the water sample for MSPE. The amount of analyte extracted was established from the peak areas in the resulting chromatograms and from the calibration equations constructed through the direct injection of 2 μL of standard solutions of the analytes in the 1–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration range.

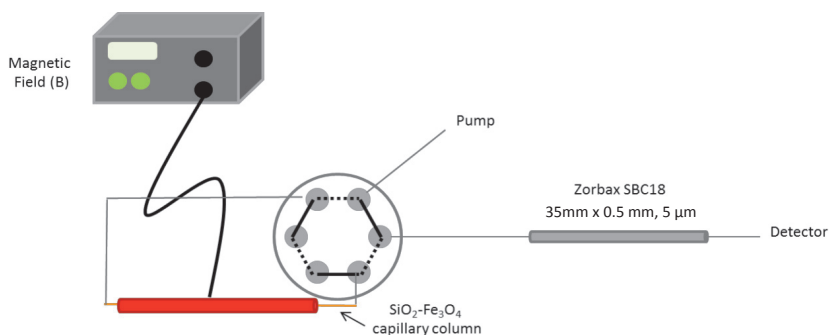


Fig. S1. Schematic diagram of the Magnetic-IT-SPME-CapLC-DAD system

Absorbance of the analytes was registered at 230 nm. Spectra of the analytes were also registered. All solvent were filtered through a 0.45 mm nylon membranes (Teknokroma) before use. All the experiments were carried out in triplicate.

Preparation and characterization of the silica supported Fe_3O_4 NPs and magnetic capillary column.

Fe_3O_4 NPs were synthesized by previously reported approaches [1,2]. Briefly, 0.706 g of $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 2.013 g of 1,2-hexadecanediol, 1.695 g of oleic acid, 1.605 g of oleyamine and 20 mL of phenyl ether (under Ar stream (20 min)) were refluxed at 263°C during 30 min. After cooled to room temperature, 80 mL of ethanol was added to the reaction mixture and centrifuged. Then, the mixture was redissolved in hexane (20 mL). Finally, water soluble Fe_3O_4 NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CTAB}$) were obtained by adding 20 mL of 0.1 M CTAB to the hexane extracts and rotaevaporating the mixture until complete elimination of hexane.

The synthesis of the sorbent material was carried out according to the method reported by our group. Typically, 2.5 mL of a mixture of PEG (0.9 g) and urea (0.9 g) in 10 mM acetic acid (10 mL) was mixed with 1 mL of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CTAB}$ water dispersion, adjusted to pH 11 with 1 M NaOH (7 mL) and 1 mL of TEOS, which polymerized hybrid sorbent. This mixture was stirred until it became a homogeneous gel. Then, 60

μL of this gel was injected into the fused silica capillary column previously treated with 1 M NaOH. According to the previously work, the ends of the capillary were sealed and placed into an oven 20 h at 43 °C. After, the temperature was raised to 120 °C at 0.5 °C/min and kept constant for 2 h, followed by water and methanol washes. After drying, the capillary was heated at 330 °C for 25 h. This capillary was used as injection loop for Magnetic-IT-SPME. The rest of the gel was isolated by centrifugation (10000 rpm, 10 min) and vacuum dried during 24 h to obtain the magnetic hybrid sorbent material for MSPE.

Characterization

SEM images were acquired using a HITACHI-S4100 equipment operated at 20 kV. Atom composition of the sorbent material was measured using a Philips SEM XL30 equipped with an EDAX microprobe. For HRTEM images a Philips Tecnai F20 equipment operating at 200 kV was employed. Samples for electron microscopy were prepared with a drop of the synthesised material suspension onto a lacey carbon/formvar-coated copper grid. A Quantum Design MPMS Squid Magnetometer was used to measure the magnetic properties. Magnetic measures were carried out with variable-temperature ($T=2$ K) and field-dependent (applied field: 150 Oe) dc measurements. The same device was used in the ac susceptibility measurements at different frequencies of the oscillating field of 17 G amplitude.

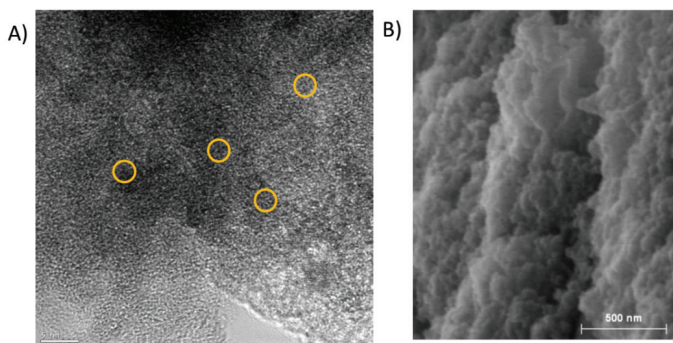


Fig. S2. A) HRTEM image SiO₂ supported Fe₃O₄ NPs and B) SEM micrographs of the internal surface of the silica supported Fe₃O₄ capillary for Magnetic-IT-SPME

Adsorption isotherms

50 mg of sorbent were added to 20 mL of a mixture of chlorfenvinphos and chlorpyrifos and after 60 min as adsorption time, the magnetic sorbent was isolated from the solution with a Nd disk magnet and the residual analytes were determined by using a previously reported method proposed in [3].

Table S1. Parameters of Langmuir and Freundlich isotherms

	Langmuir			Freundlich		
	Q_{\max}	K_L	R^2	$1/n$	K_F	R^2
Chlorfenvinphos	0.46	0.020	0.9841	0.66	0.018	0.9601
Chlorpyrifos	0.90	0.013	0.9851	0.74	0.019	0.9522

Extraction conditions and Detoxification procedure

In preliminary studies, the sorption capacity of the magnetic sorbent for MSPE was evaluated by adding 10, 20, 30 and 50 mg of sorbent to 2 mL of a mixture of chlorfenvinphos and chlorpyrifos ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) with a contact time of 60 min (see Figure S3).

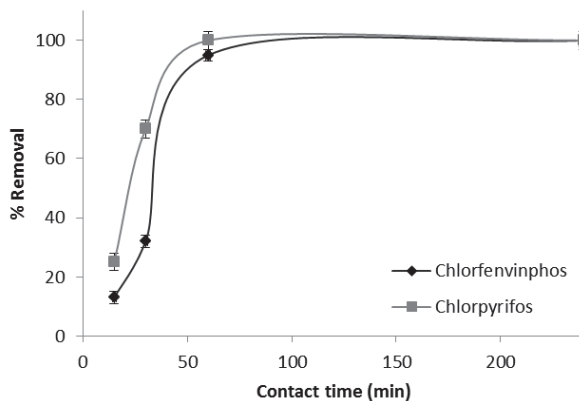


Fig. S3. Adsorption kinetics of chlorfenvinphos and chlorpyrifos ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) in the silica support Fe_3O_4 magnetic material

After the adsorption time, the magnetic sorbent was isolated from the solution with a Nd disk magnet and the residual analytes in the solution were determined. Adsorption near to 100% was found when using 50 mg of sorbent. Water volumes between 2 and 100 mL were studied in order to evaluate the adsorption of the analytes as function of the volume of sample. In this study the amount of sorbent was 50 mg and 60 min as adsorption time. With volumes lower than 20 mL, the separation of the sorbent and the water samples is immediate, but with higher volumes it is necessary to establish a separation time. The use of the magnetic sorbent for magnetic solid phase extraction of chlorfenvinphos and chlorpyrifos was carried out by using 20 mL of sample taking into account the extraction and separation time and the detection limits that can be reached with the IT-SPME system. Previous to each extraction, a cleaning step of the magnetic NPs was carried out in order to obtain clean extracts. A mixture of water and methanol was used as cleaning solvent.

The elution of the target analytes from the magnetic sorbent was carried out with methanol. In this case 500 μ L of methanol were necessary to completely elute chlorfenvinphos and chlorpyrifos from the magnetic sorbent. Lower volumes did not quantitatively extract the analytes and higher volumes were disadvantageous due to the higher dilution of the sample. After that, water was added to that solution to achieve a mixture 1:3 methanol: water and finally, 1500 μ L were processed in the chromatographic system. The application of the magnetic sorbent for removal procedures required to process high sample volumes, and so the separation time was studied. With 100 mL of water sample, we observed that 15 min applying the magnetic field was enough to achieve the complete separation of the sorbent material and from the water sample. Under these conditions, the results obtained showed that removal efficiency was not depending on the volume of sample. The separation time increased with and increment in the water volume processed, thus we selected 100 mL for further studies.

100 mL of wastewater samples collected in the effluents of different wastewater treatment plant were agitated during 60 min with 50 mg of magnetic sorbent. The detoxification efficiency was evaluated by analysing the residual concentration in the supernatant with the procedure described in [3]. In all cases, the concentration of chlorfenvinphos and chlorpyrifos in the wastewater samples were below the detection

limits. Thus, spiked wastewater samples (3 and $4 \mu\text{g L}^{-1}$ for chlorfenvinphos and chlorpyrifos, respectively) were processed.

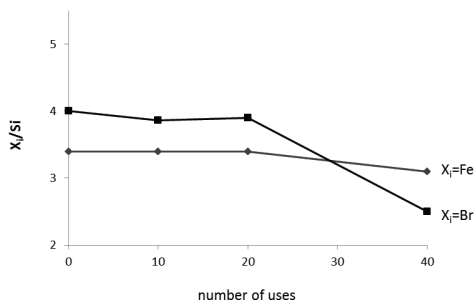


Fig. S4. Variation of the magnetic sorbent material composition as function of the number of uses. $X_i=Fe$ or Br

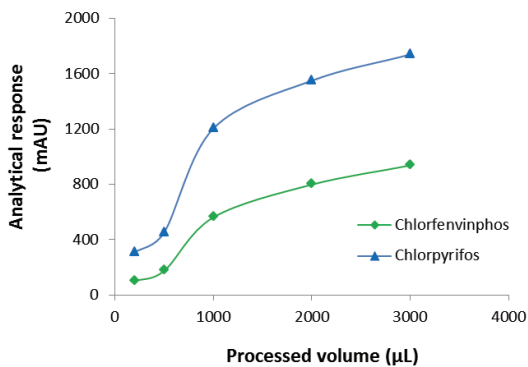


Fig. S5. Variation of the analytical response of chlorfenvinphos and chlorpyrifos ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) as function of processed volume in the Magnetic-IT-SPME approach

References

- [1] Sun S, Zheng H (2002) Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8204-8205.
- [2] Fan H, Yang K, Boye DM, Simon T, Malloy KJ, Xu H, Lopez GP, Brinker CJ (2004) Self-assembly of ordered, robust, three-dimensional gold nanocrystal/silica arrays. *Science* 304: 567-571.
- [3] Moliner-Martinez Y, Molins-Legua C, Verdú-Andrés J, Herráez-Hernández R, Campins-Falco P (2011) Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr A* 1218: 6256-6262.
- [4] Zhao, Q, Lu, Q, Feng, Y.-Q. (2013) Dispersive microextraction based on magnetic polypyrrole nanowires for the fast determination of pesticide residues in beverage and environmental water samples. *Anal. Bioanal.Chem.*405 : 4765- 4776.
- [5] Heidari, H., Razmi, H. (2012) Multi-response optimization of magnetic solid phase extraction based on carbon coated Fe₃O₄ nanoparticles using desirability function approach for the determination of the organophosphorus pesticides in aquatic samples by HPLC-UV. *Talanta* 99: 13-21

Corresponding author: E-mail address: pilar.campins@uv.es. Tel 34-96-3543002; Fax 34-96-3544436.

Anexo 3.

In situ colorimetric quantification of silver cations in the presence of silver nanoparticles.

González-Fuenzalida, R. A., Moliner-Martínez, Y., González-Béjar, M., Molins-Legua, C., Verdú-Andres, J., Pérez-Prieto, J., Campins-Falcó, P.

In Situ Colorimetric Quantification of Silver Cations in the Presence of Silver Nanoparticles

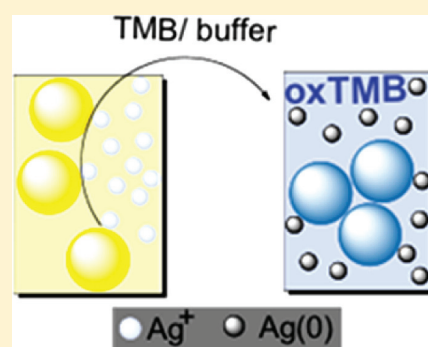
R. A. González-Fuenzalida,[†] Y. Moliner-Martínez,^{*,†} María González-Béjar,^{*,‡} C. Molins-Legua,[†] J. Verdú-Andres,[†] Julia Pérez-Prieto,[‡] and P. Campins-Falcó[†]

[†]Department of Analytical Chemistry, University of Valencia Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

[‡]Instituto de Ciencia Molecular (ICMol)/ Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valencia, C/Catedrático José Beltrán 2, 46980, Paterna, Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Silver ions (Ag^+) can be quantified in situ in the presence of AgNPs by using a colorimetric sensing probe (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). Interestingly, it also enables detection of the Ag^+ adsorbed on the AgNP surface. This is relevant to design new methods to make AgNPs while ensuring the total reduction of Ag^+ .



Silver nanoparticles (AgNPs) are nowadays the most widely commercialized nanomaterial (hundreds of tons per year).¹ Their antibacterial properties make them suitable for applications based on consumer-oriented products, such as components of detergents, clothing, fabrics, food additives, and medical devices, among others.^{2–7} AgNPs progressively release Ag^+ ions from their crystalline core under aerobic conditions.^{8,9} In fact, there is an open debate on which species is actually the toxicant, the AgNPs or the Ag^+ ions released from their surface. It has been postulated that the antibacterial activity of Ag^+ , as well as their environmental impacts, could be controlled by modulating its release from the AgNPs.¹⁰

Moreover, studies performed in natural waters under field conditions suggest that the release of Ag^+ is highly influenced by the size and capping of the AgNPs.¹¹ The initial and dominant process seems to be desorption of chemisorbed Ag^+ from the nanoparticle surface,⁷ while the oxidative dissolution seems to be considerably slower.

On the other hand, the development of simple probes to determine the production yield of AgNPs from Ag^+ reduction is also a demand for the industry of nanotechnology. Currently, all methods used to quantify AgNP production require previous conversion of the AgNPs back to Ag^+ : inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) combined with an extraction procedure (cloud-point extraction^{12,13} or field flow fractionation^{14–16}); size exclusion chromatography;¹⁷ counter current chromatography;^{18,19} electrophoresis;²⁰ and fluorimetry.²¹ Consequently, the aim of this work was to find a method to be able to differentiate easily between AgNPs and Ag^+ “in situ”. This will be highly applicable to develop new methods to

make AgNPs or to improve currently used ones. Moreover, an “in situ” protocol will be developed to follow the reaction progress and determine the real yield of AgNP production as well as to estimate the specific amount of reductant needed for each synthesis.

EXPERIMENTAL SECTION

Derivatization Procedure and UV–Visible Measurement. A volume of 1.2 mL of Ag^+ standard solutions, AgNP solutions, or AgNP solutions spiked with Ag^+ were mixed with 100 μL of TMB solution (10 mM in ethanol) and 200 μL of NaAc/AcH (pH = 4) buffer solution. After the optimum reaction time, the solutions were directly measured with a fiber optic probe of the UV–vis spectrophotometer. Optimization of the TMB concentration and reaction time was carried out. Aliquots from photochemical or thermal syntheses under different conditions were processed with the proposed procedure. AgNPs using thermal synthesis were diluted (1:2) before being processed.

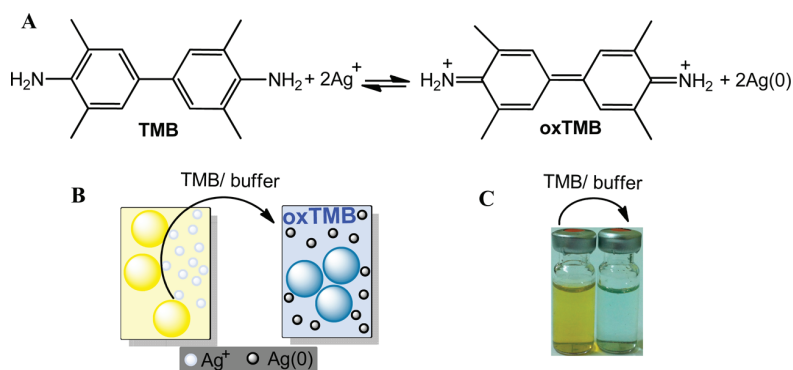
AgNPs Purification. Volumes of 1.2 mL of AgNPs solutions were passed through cationic exchange cartridges (Strata SCX, benzene sulfonic acid group bounded to silica particle, 55 μm , 3 mL), previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water. The derivatization reaction was carried out in the eluted solution.

Received: September 5, 2013

Accepted: October 16, 2013

Published: October 16, 2013

Scheme 1. (A) Oxidation of TMB by Ag^+ ; (B) Schematic Representation of the “in Situ” Detection of Residual Ag^+ after the Synthesis of AgNPs; (C) in Situ Colorimetric Visualisation, Ag^+ (4 ppm)



RESULTS AND DISCUSSION

Recently, Liu et al. have used 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as a selective and sensitive indicator of Ag^+ (Scheme 1A).²² The addition of TMB and a buffer solution (NaAc/AcH) to an aqueous colorless solution containing Ag^+ gives rise to the oxidized form of TMB (oxTMB) and $\text{Ag}(0)$. This can be followed by absorption spectroscopy (typical peaks of oxTMB at ~ 370 and 655 nm) and visually detected due to the color change from yellow to blue (Figure 1, vial 1). We demonstrate

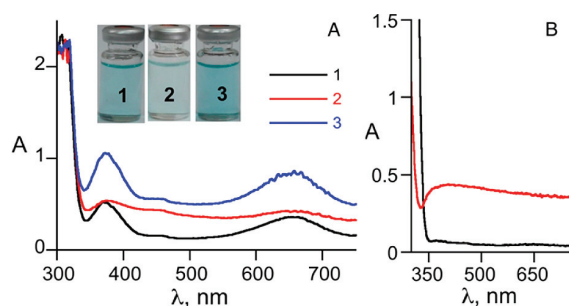


Figure 1. (A) Absorption spectra of samples 1–3 registered 15 min after addition of TMB/buffer solution. Inset: Pictures of vials 1–3 containing (1) the resulting solution after mixing TMB (6 mM) and Ag^+ (4 ppm); (2) TMB/buffer solution added to AgNPs, and (3) TMB/buffer solution added to the photochemically generated AgNPs and spiked with 4 ppm of Ag^+ standard. (B) Absorption spectra of the blank (black line) and AgNPs in the presence of NaAc/AcH buffer (red line).

here that TMB can be used “in situ” for quantification of Ag^+ in the presence AgNPs. This accurate, fast, and cheap colorimetric probe also confirms the presence of residual Ag^+ ions on the nanoparticle surface, even in the case of highly efficient procedures of AgNP synthesis.

AgNPs were generated by three different strategies, one photochemical²³ and two thermal^{24,25} (Table 1, Figures S1–S6 in the Supporting Information). Photochemical methods^{23,26} make the “in situ” generation of a reductant (a radical) of Ag^+ at room temperature possible, thus avoiding the need for high temperatures.²⁷ In addition, they prevent the use of high concentrations of hazardous chemicals and extended reaction times. Thus, water-dispersible AgNPs were obtained by simple UVA-irradiation of a photoinitiator (I-2959) in the presence of AgNO_3 and sodium citrate in 5 min.²³ The absorption spectrum showed the characteristic surface plasmon band of

Table 1. Synthetic Strategies Used Here to Make AgNPs and Residual $[\text{Ag}^+]$ Concentration Obtained with the Colorimetric Probe

synthesis strategy	T ($^{\circ}\text{C}$)	reagent	time (min)	$[\text{Ag}^+]$ (ppm)
photochemical UVA lamp	room temperature	I-2959 citrate	5	2.0 ± 0.9^a
			10	1.3
			15	1.6
thermal (1)	70	NaBH_4 (0.1%)	20	1.5
			5	3.6
			10	2.7
			15	2.7
			60	2.5
thermal (2)	95	NaBH_4 (0.04%) citrate/glycerol	60	36.0
			60	<LOD

^aMean of three independent syntheses under the same conditions.

AgNPs centered at ~ 400 nm (yellow solutions; Figure S1 in Supporting Information).

In order to check if the matrix in which the AgNPs were synthesized interfered with the colorimetric probe, a TMB/buffer solution (TMB, $100 \mu\text{L}$, 10 mM in ethanol; NaAc buffer, $200 \mu\text{L}$, 1 M; pH = 4) was added to a blank solution (1.2 mL), which contained the same concentration of I-2959 and sodium citrate as that used for the AgNP synthesis. A colorless solution was obtained (see blank in Figure 1B).

Then, the TMB/buffer solution was added to the reaction mixture once the AgNPs had been generated, leading to a yellow-to-bluish color change, indicative of oxidation of TMB by the residual Ag^+ present in the synthetic medium and maybe also on the nanoparticle surface (vial 2 Figure 1 and Scheme 1B). The absorption spectrum of this solution showed the oxTMB peaks superimposed on the typical spectrum of aggregated nanoparticles (red line in Figure 1A). In fact, control experiments showed that the buffer induces the formation of AgNP aggregates (Figure 1B, red line). Similarly, the addition of a TMB/buffer solution spiked with Ag^+ (4 ppm) to the AgNPs colloid gave rise to more intense absorbance peaks of oxTMB (Figure 1A, blue line).

On the basis of these findings, we presumed that the residual Ag^+ in the AgNP solution could be determined by using TMB, since neither the matrix in which the AgNPs were synthesized nor the nanoparticle interfered with the analysis. Therefore, the dependence of the colorimetric signal (absorbance at 656 nm)

vs TMB concentration and the reaction time were evaluated in order to reach the maximum response. The optimum conditions were 0.66 mM for TMB concentration and 15 min as reaction time (see Figure S7 in the Supporting Information). The quantitative analysis was performed by using the standard addition method (SAM), spiking the AgNPs solution with Ag^+ in order to evaluate the influence of the media in the probe response. The working concentration range of Ag^+ (with or without AgNPs) was within the 0–15 ppm range.

The absorbance increase between 543 and 656 nm ($\Delta A_{656-543}$) was used as the analytical signal, in order to obtain a corrected signal that compensates the increment on the baseline. The $\Delta A_{656-543}$ dependence on the amount of Ag^+ added for the real sample was compared with an external calibration (Figure 2). The $\Delta A_{656-543}$ changes showed a linear

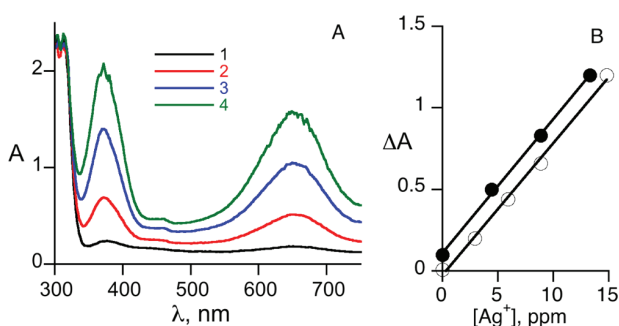


Figure 2. (A) Absorption spectra of silver standards with increasing amounts of Ag^+ (0–15 ppm) in the presence of TMB (0.66 mM). (B) Comparison of the slopes of the calibration equations obtained with SAM (black circles) and an external calibration (white circles).

dependence with the Ag^+ concentration for both calibration plots and the slopes of the calibrations equations were statistically comparable, $(10.0 \pm 0.4) \times 10^{-2}$ ppm and $(10.5 \pm 0.8) \times 10^{-2}$ ppm for external calibration and SAM, respectively. This confirms that AgNPs do not interfere in the quantification of the residual Ag^+ . The same analysis was performed on three other samples containing the same amount of reagents but independently prepared and irradiated under the same conditions to evaluate the synthesis-to-synthesis reproducibility of the method. Negligible differences in the slope of the calibration equations were observed. This positive result indicates that the proposed probe can be successfully used to quantify the presence of residual Ag^+ in the synthesis medium by directly using an external calibration. The detection limit (as the concentration that provided a signal-to-noise ratio of 3, considering the standard deviation of 10 chemical blanks) of the proposed probe was established at 0.6 ppm of Ag^+ . This detection limit was satisfactory to control the conversion yield of cationic silver into AgNPs, taking into account that the initial amount of AgNPs precursor is in the range of tens of ppm.

The absorbance of the samples was registered 15 min after TMB addition to determine the AgNPs yield in the three different syntheses. The estimated residual Ag^+ concentration was 2.3, 3.0, and 1.1 ppm for synthesis 1, 2 and 3, respectively. In addition, samples diluted 400 times were analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) to determine the total silver content in these samples.

This analysis indicated the Ag content was 20.4 ± 1.2 ppm. Therefore, the AgNPs amount in synthesis 1, 2, and 3 was 18.1,

17.5, and 19.3 ppm, respectively. The utility of the proposed colorimetric probe was also proved for AgNPs samples synthesized using different irradiation times (5, 10, 15, and 20 min); this showed a yield variation of only 4%. It is noted that the total concentration of AgNPs produced in a synthesis is up to now estimated by means of the size and shape of the AgNPs measured by electron microscopy images (TEM/SEM) and assuming a total conversion of Ag^+ into AgNPs.^{28,29} The proposed method would make a more accurate estimation of AgNPs yield possible because it will determine the real conversion of Ag^+ to nanoparticles.

Moreover, isolation of AgNPs from Ag^+ was carried out by using cationic exchange cartridges (Strata SCX). Thus, Ag^+ can be quantitatively retained while AgNPs are eluted (see the Experimental Section). The AgNPs absorbance did not change after this purification step, while the eluted solution still showed response to the colorimetric probe (Figure S8 in the Supporting Information).

This result is worth mentioning since it indicates that the colorimetric probe enables detection of Ag^+ adsorbed on the AgNP surface (maybe also of cationic centers within the nanoparticle surface). This hypothesis was verified by spiking a AgNPs solution with Ag^+ (4 ppm), followed by passing this solution through SCX cartridges, and finally adding TMB to the eluted solution. We observed a similar response to TMB for the spiked- and nonspiked eluted solutions (Figure S8 in the Supporting Information). This comparison confirms that the colorimetric probe detects not only the free residual Ag^+ but also the Ag^+ adsorbed on the AgNP surface. However, we could not quantify the adsorbed Ag^+ because it was in a quantity below the quantification limit. Therefore, the colorimetric probe quantifies the total Ag^+ in the AgNP solution, thus allowing a successful analysis of residual Ag^+ (Scheme 1B).

Then, we tested the applicability of our strategy to quantify the production of AgNPs from Ag^+ by using two well-known thermal methods of AgNPs synthesis. One of them uses sodium citrate as the mild reductant of Ag^+ and the other one NaBH_4 (see the Supporting Information). The first one (with sodium citrate) was tested for two different syntheses. The SAM calibration equations for them were $y = (9 \pm 1) \times 10^{-2}x + (0.12 \pm 0.08)$ and $y = (9 \pm 1) \times 10^{-2}x$. The second reaction was performed with two $\text{NaBH}_4/\text{Ag}^+$ ratios, 0.1% and 0.04% (w/v) of NaBH_4 concentration in each condition. In the first case, the reaction was followed for 5, 10, 15, and 60 min. The slopes of the calibrations equations for 5 and 60 min were $(9.5 \pm 0.4) \times 10^{-2}$ ppm and $(9.0 \pm 0.5) \times 10^{-2}$ ppm, respectively. The AgNPs yield varied from ~90% for the shorter times to $97 \pm 5\%$ after 1 h. When using 0.04% (w/v) NaBH_4 , the $[\text{Ag}^+]$ was $36 \pm 6\%$ after heating at 70 °C for 1 h.

Remarkably, in all the AgNPs syntheses, the control analyses demonstrated that the matrix in which the nanoparticles were synthesized did not interfere with the analysis. A *t* test showed that the slopes for the samples prepared either by thermal or photochemical methods were statistically comparable at a confidence level of 95%. Therefore, this strategy could be successfully extended to other AgNPs synthetic methods provided that the AgNPs are not too big, since in such case the scattering would become a problem.

CONCLUSIONS

In summary, we report here a general, simple, accurate, and rapid strategy to determine the transformation of Ag^+ into AgNPs by measuring it directly in the reaction media, thus

avoiding any additional extraction or separation steps. Moreover, we have demonstrated that some Ag⁺ remains adsorbed on the AgNPs surface. This probe can be successfully used for the in situ quantification of AgNPs yield in the lab and it is also relevant for technical or industrial applications in the nanotechnology field.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Experimental methods, TEM pictures, and UV–visible absorption spectra of AgNPs. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

■ Corresponding Authors

*E-mail: yolanda.moliner@uv.es. Fax: +(34)963544436. Phone: +(34)963544334.

*E-mail: maria.gonzalez@uv.es. Fax: +(34)963543576. Phone: +(34)963544315.

■ Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank GV (PROMETEO 2012/045, ACOMP2013/008), MINECO (CTQ2011-27758; M.G.B. JdC), FP7-PEOPLE-CIG-2011 to M.G.B., and UV (UV-INV-PRECOMP12-80490; R.A.G.-F. Atracció de Talents predoctoral grant) for financial support.

■ REFERENCES

- (1) Nowack, B.; Krug, H. F.; Height, M. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 1177–1188.
- (2) Alarcón, E.; Udekwi, K.; Skog, M.; Pacioni, N. L.; Stampelcoskie, K. G.; González-Béjar, M.; Poliseti, N.; Wickham, A.; Richter-Dahlfors, A.; Griffith, M.; Scaiano, J. C. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4947–4956.
- (3) Kumar, A.; Vemula, P. K.; Ajayan, P. M.; John, G. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 236–241.
- (4) Guzman, K. A. D.; Taylor, M. R.; Banfield, J. F. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 1401–1407.
- (5) Varner, K. E.; El-Badawy, A.; Feldhake, D.; Venkatapathy, R. *State-Of-The-Science Review: Everything NanoSilver and More*; Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2010.
- (6) Srivastava, A.; Mishra, V.; Singh, P.; Kumar, R. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *126*, 395–407.
- (7) Lok, C. N.; Ho, C. M.; Chen, R.; He, Q. Y.; Yu, W.; Sun, H.; Tam, P. K. H.; Chiu, J. F.; Che, C. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 527–534.
- (8) Kittler, S.; Greulich, C.; Diendorf, J.; Köller, M.; Epple, M. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4548–4554.
- (9) Liu, J.; Hurt, R. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 2169–2175.
- (10) Xiu, Z.; Zhang, Q.; Puppala, H. L.; Colvin, V. L.; Alvarez, P. J. J. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 4271–4275.
- (11) Dobias, J.; Bernier-Latmani, R. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4140–4146.
- (12) Liu, J. F.; Chao, J. B.; Liu, R.; Tan, Z. Q.; Yin, Y. G.; Wu, Y.; Jiang, G. B. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6496–6502.
- (13) Chao, J. B.; Liu, J. F.; Yu, S. J.; Feng, Y. D.; Tan, Z. Q.; Liu, R. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6875–6882.
- (14) Ulrich, A.; Losert, S.; Bendixen, N.; Al-Kattan, A.; Hagedorfer, H.; Nowack, B.; Adlhart, C.; Ebert, J.; Lattuada, M.; Hungerbühler, K. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1120–1130.
- (15) Mitrano, D. M.; Barber, A.; Bednar, A.; Westerhoff, P.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1131–1142.

(16) Poda, A. R.; Bednar, A. J.; Kennedy, A. J.; Harmon, A.; Hull, M.; Mitrano, D. M.; Ranville, J. F.; Steevens, J. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4219–4225.

(17) Novak, J. P.; Nickerson, C.; Franzen, S.; Feldheim, D. L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5758–5761.

(18) Shen, C. W.; Yu, T. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 5962–5967.

(19) Tiede, K.; Borxall, A. B. A.; Tiede, D.; Tear, S. P.; David, H.; Lewis, J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 964–972.

(20) Liu, F. K.; Ko, F. H.; Huang, P. W.; Wu, C. H.; Chu, T. C. *J. Chromatogr., A* **2005**, 139–145.

(21) Chatterjee, A.; Santra, M.; Won, N.; Kim, S.; Kyung Kim, J.; Bin Kim, S.; Han Ahn, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2040–2041.

(22) Liu, S.; Tian, J.; Wang, L.; Sun, X. *Sens. Actuators, B* **2012**, *165*, 44–47.

(23) Stampelcoskie, K. G.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1825–1827.

(24) Wan, Y.; Guo, Z.; Jiang, X.; Fang, K.; Lu, X.; Zhang, Y.; Gu, N. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *394*, 263–268.

(25) Steinigeweg, D.; Schlücker, S. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8682–8684.

(26) Quaresma, P.; Soares, L.; Contar, L.; Miranda, A.; Osório, I.; Carvalho, P. A.; Franco, R.; Pereira, E. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1889–1893.

(27) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707.

(28) Mitrano, D. M.; Leshner, E. K.; Bednar, A.; Monserud, J.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 115–121.

(29) Shamel, K.; Ahmad, M. B.; Zargar, M.; Yunus, W. M. Z. W.; Shabanzadeh, P.; Moghaddam, M. G. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 271.

■ NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

This paper was published ASAP on October 21, 2013. The Acknowledgments were modified and the revised version was reposted on October 22, 2013.

Anexo 3.

Supporting Information

for

**In situ colorimetric quantification of silver cations in the
presence of silver nanoparticles.**

Supporting information for

In situ colorimetric quantification of silver cations in the presence of silver nanoparticles

Rodrigo A. González-Fuenzalida, Yolanda Moliner-Martínez,* María González-Béjar,* Carmen Molins-Legua, Jorge Verdú-Andres, Julia Pérez-Prieto, Pilar Campins-Falcó

Experimental Section

General information. UV-visible spectra were registered with a Varian Cary 60 Fiber Optic UV-vis spectrophotometer. A Perkin Elmer 4100 ZL Zeeman Atomic Absorption Spectrometer equipped with a graphite furnace was used for the determination of the total analyte content. The wavelength was set at 328.1 nm.

TMB solution (Aldrich) 10 mM was prepared in ethanol (>99.8% Romil SpS). Acetate buffer solution 1M (Sodium Acetate Panreac, Acetic Acid 100% Merck) was prepared in water (pH: 4). Silver standards were daily prepared by dissolving AgNO₃ (Scharlau) in water and kept in the dark. All experiments were performed with water purified through a Barnstead NANOpure II system.

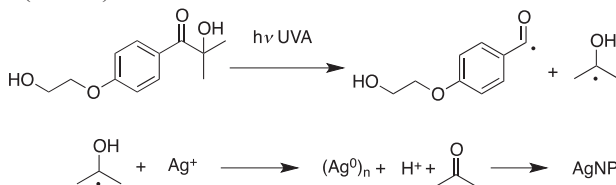
GFAAS measurements. Silver standards were prepared in water (working range 0-100 ppb). AgNP samples were conveniently diluted in water to obtain concentrations within this working concentration range.

AgNP syntheses. All experiments were carried out in Milli-Q water (18.2 MΩ). AgNO₃, glycerol, trisodium citrate and I-2959 (Irgacure-2959: 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone) were purchased from Aldrich and used as received.

AgNPs were synthesized using 3 different methods previously described in the literature (See below).

Photochemical synthesis.¹

Briefly, aqueous solutions containing 0.2 mM AgNO₃, 0.2 mM I-2959 and 1 mM trisodium citrate were purged with N₂ for 20 minutes to remove O₂ and then, exposed to UVA irradiation in an LZC-4 Luzchem photoreactor (UVA lamps (8-W HITACHI FL8BL-B; λ=(350 nm).



Scheme S1. Photochemical synthesis of AgNPs starting from a ketyl radical generation upon I-2959 UVA light excitation and followed by Ag⁺ reduction.¹ Citrate not shown in this scheme although it is fundamental to stabilize the generated AgNPs.

Thermal syntheses

1. Citrate as reductant.² Briefly, a 50 mL glycerol-water mixture (40 vol% glycerol) was stirred (1200 rpm, 2.5 cm stirring bar) in a 100 mL flask and heated up to 95 °C.

Then, 9 mg of silver nitrate, and 1 min later, 1 mL of sodium citrate (3%) were added to the solvent mixture. The reaction mixture was stirred for 1 h at 95°C. The AgNPs were stored in a plastic centrifuge tube once room temperature was reached. Figure S3 shows the UV-Visible spectrum of diluted AgNPs (2:15).

2. NaBH_4 as reductant.³ A 20 mL of 1% (w/v) citrate solution and 75 mL of water were added in a round flask and the mixture was heated to 70°C for 15 min. After that, 1.7 mL of 1% (w/v) AgNO_3 solution was introduced to the mixture, followed by the quick addition of 2 mL of freshly prepared NaBH_4 solution. Two different syntheses were carried out with different NaBH_4 amounts: 0.1%(w/v) or 0.04%(w/v). The reaction mixture was kept at 70°C under vigorous stirring for 1 h and cooled to room temperature. Water was added to bring the volume of dispersion to 100 mL. Figure S5 shows their UV-Visible spectrum of diluted AgNPs (2:12).

Further AgNP characterization was performed by using transmission electronic microscope (TEM) with a JEM-1010 from Jeol Ltd. operated at 100 kV. TEM samples were prepared by delivering 10 μL of the AgNPs suspension onto a carbon-coated copper grid (300 mesh), which was subsequently dried overnight at room temperature. Nanoparticle sizes were calculated by using ImageJ software.⁴ The concentration of nanoparticles was estimated from TEM experiments as described elsewhere.⁵

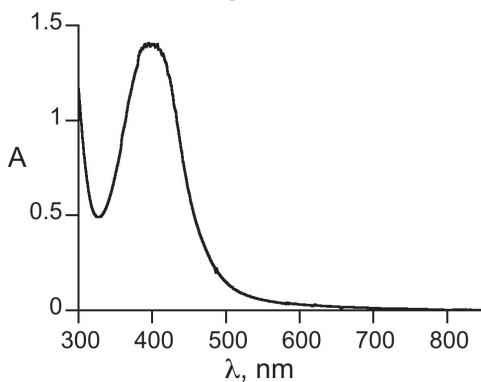


Figure S1. Absorption spectra for colloidal AgNPs prepared by using I-2959 as photoinitiator and sodium citrate as stabilizing agent upon UVA irradiation up to 15 minutes.

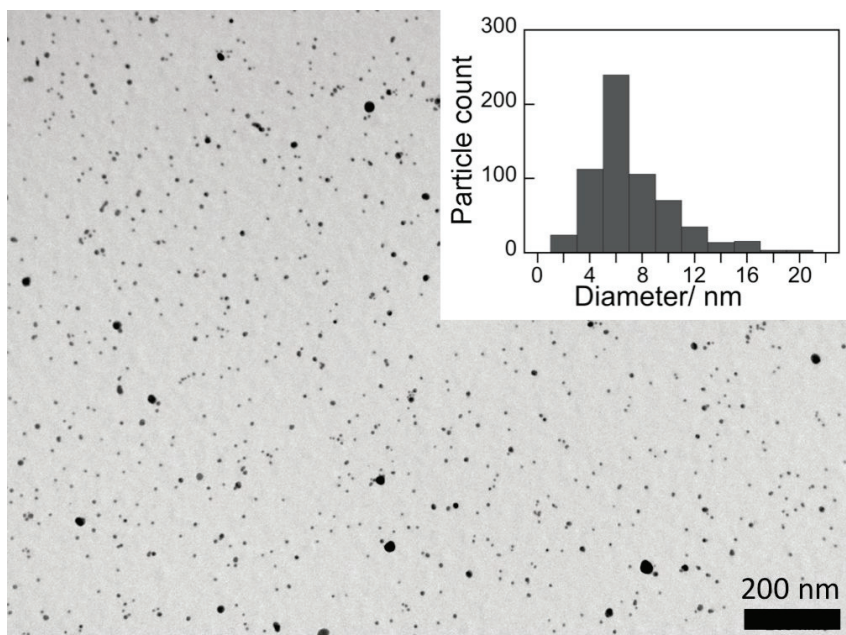


Figure S2. Representative TEM micrograph of the citrate stabilized AgNPs and the histogram with their size distribution.

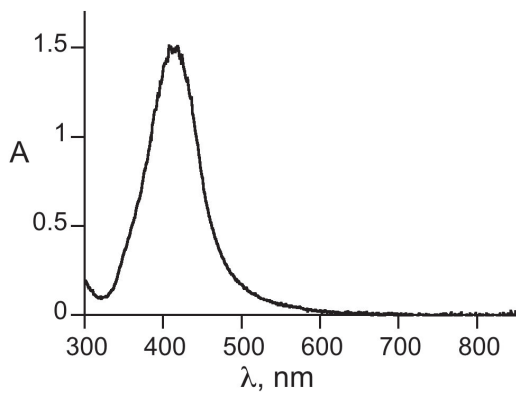


Figure S3. Absorption spectrum for colloidal AgNPs prepared thermally by heating a glycerol-water mixture (40% volume glycerol), silver nitrate and sodium citrate at 95°C.²

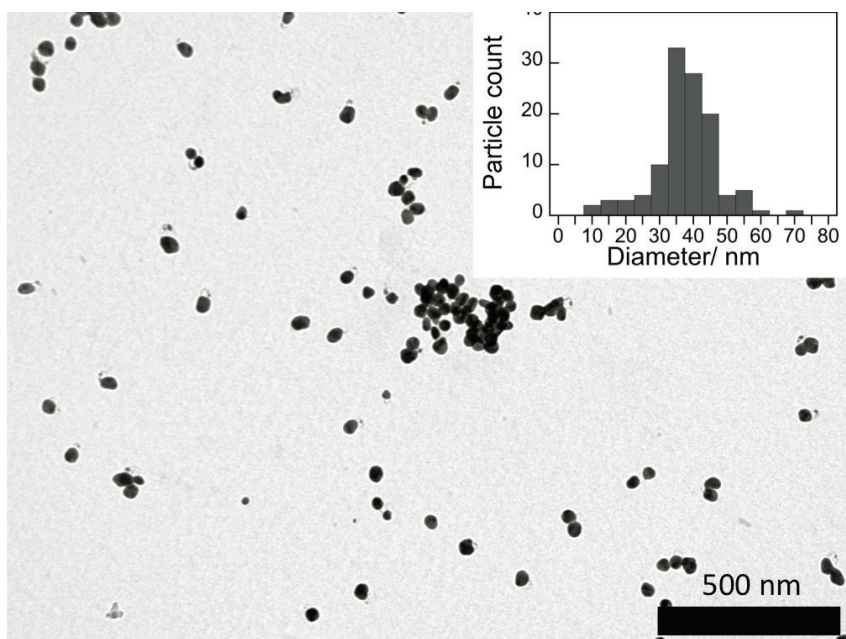


Figure S4. Representative TEM micrograph of the citrate stabilized AgNPs synthesized thermally and the histogram with their size distribution.

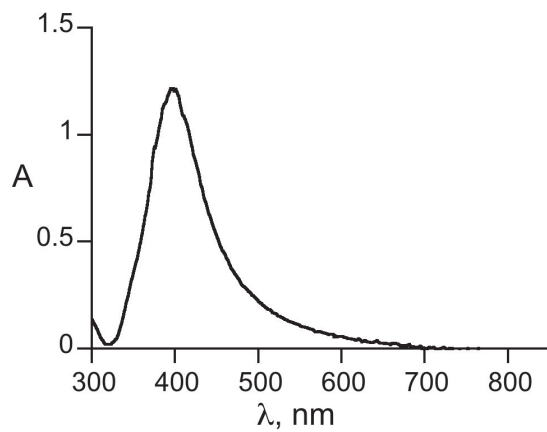


Figure S5. Absorption spectrum for colloidal AgNPs synthesized thermally by reduction with NaBH_4 .³

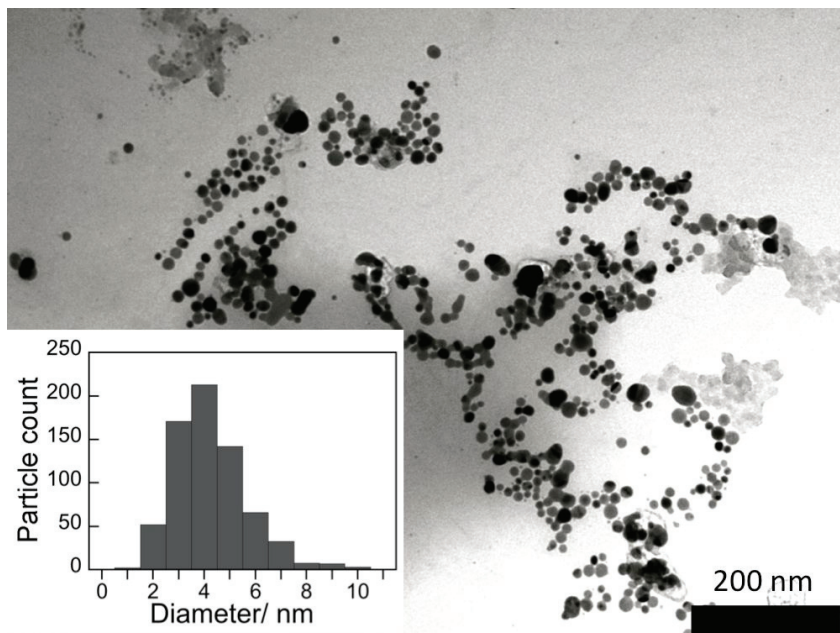


Figure S6. Representative TEM micrograph of AgNPs synthesized by using NaBH₄ and the histogram with their size distribution.

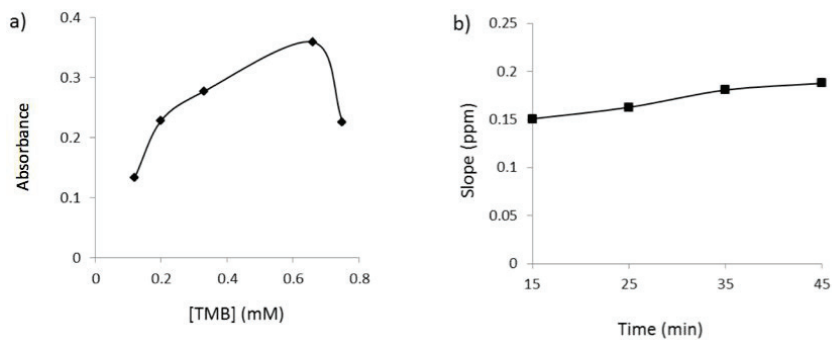


Figure S7. (a) Variation of the colorimetric probe response with TMB concentration. (b) Variation of the slope of the calibration equation as a function of the reaction time.

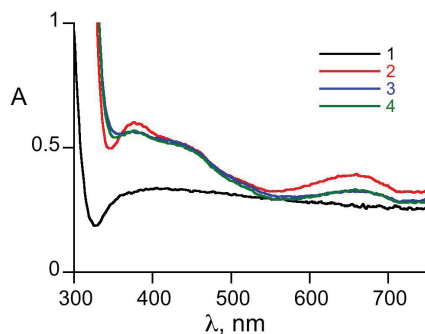


Figure S8. Absorption spectra registered after addition of TMB to a AgNP solution (1), a AgNP solution passed through a SCX cartridge (2), the AgNP solution spiked with 4 ppm Ag^+ and passed through the SCX cartridge (3). The spectrum of the eluted AgNPs in the absence of TMB has been included for comparison (4).

References

- (1) Stampelcoskie, K. G.; Scaiano J. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 1825-1827.
- (2) Steinigeweg, D.; Schlücker, S. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 8682-8684.
- (3) Wan, Y.; Guo, Z.; Jiang, X.; Fang, K.; Lu, X.; Zhang, Y.; Gu, N.; *J. Coll. Inter. Sci.*, **2013**, *394*, 263-268.
- (4) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. *Nat. Methods*, **2012**, *9*, 671-675.
- (5) Hornyak, G. L; Dutta, J.; Tibbals, H. F.; Rao, A. K. *Introduction to Nanoscience*, CRC Press, 2008.

Anexo 4.

Evaluation of superparamagnetic silica nanoparticles for extraction of triazines in magnetic in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography.

González-Fuenzalida, R. A., Moliner-Martínez, Y., Prima-García, H., Ribera, A., Campins-Falcó, P., Zaragoza, R. J.

Article

Evaluation of Superparamagnetic Silica Nanoparticles for Extraction of Triazines in Magnetic in-Tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography

R. A. González-Fuenzalida ¹, Y. Moliner-Martínez ¹, Helena Prima-García ², Antonio Ribera ², P. Campins-Falcó ^{1,*} and Ramon J. Zaragoza ³

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, Burjassot, Valencia E-46100, Spain; E-Mails: rodrigo.gonzalez@uv.es (R.A.G.-F.); yolanda.moliner@uv.es (Y.M.-M.)

² Instituto de Ciencia Molecular (ICMol), University of Valencia, Catedrático José Beltrán 2, Paterna, Valencia E-46980, Spain; E-Mails: helena.prima@uv.es (H.P.-G.); antonio.ribera@uv.es (A.R.)

³ Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Valencia E-46100, Spain; E-Mail: ramon.j.zaragoza@uv.es

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: pilar.campins@uv.es; Tel.: +34-963-543-002; Fax: +34-963-544-436.

Received: 24 February 2014; in revised form: 24 March 2014 / Accepted: 25 March 2014 /

Published: 2 April 2014

Abstract: The use of magnetic nanomaterials for analytical applications has increased in the recent years. In particular, magnetic nanomaterials have shown great potential as adsorbent phase in several extraction procedures due to the significant advantages over the conventional methods. In the present work, the influence of magnetic forces over the extraction efficiency of triazines using superparamagnetic silica nanoparticles (NPs) in magnetic in tube solid phase microextraction (Magnetic-IT-SPME) coupled to CapLC has been evaluated. Atrazine, terbutylazine and simazine has been selected as target analytes. The superparamagnetic silica nanomaterial (SiO₂-Fe₃O₄) deposited onto the surface of a capillary column gave rise to a magnetic extraction phase for IT-SPME that provided an enhancement of the extraction efficiency for triazines. This improvement is based on two phenomena, the superparamagnetic behavior of Fe₃O₄ NPs and the diamagnetic repulsions that take place in a microfluidic device such a capillary column. A systematic study of analytes adsorption and desorption was conducted as function of the magnetic field and the relationship with triazines magnetic susceptibility. The positive influence of magnetism on

the extraction procedure was demonstrated. The analytical characteristics of the optimized procedure were established and the method was applied to the determination of the target analytes in water samples with satisfactory results. When coupling Magnetic-IT-SPME with CapLC, improved adsorption efficiencies (60%–63%) were achieved compared with conventional adsorption materials (0.8%–3%).

Keywords: magnetic nanoparticles; triazines; magnetic susceptibility; on-line solid phase microextraction; environmental samples

1. Introduction

Magnetic nanomaterials are nowadays widely studied in many fields, such as medicine [1,2], materials science [3–5], environmental science [6,7] or chemistry [8–10]. Research based on these nanomaterials is a great deal bearing in mind the improvements that they can introduce in many applications of these fields. One of the most promising applications for magnetic nanomaterials is the use as sorbent materials, since they combine high adsorption capacity with the interesting magnetic properties of magnetic nanoparticles (NPs).

In recent years, one of the trends of analytical nanotechnology has been focused on developing magnetic nanomaterials as sorbent materials for sample pretreatment [11]. Particularly, these nanomaterials have been described for solid phase extraction (SPE), liquid-liquid microextraction (LLME) or solid phase microextraction (SPME) giving rise to the development of dispersive or magnetic SPE [7,12,13], dispersive LLME [14,15] and magnetic SPME [16,17] based procedures. These techniques take advantage of the large surface area of NPs and the interaction of magnetic nanomaterials with magnetic fields, and the advantages of its use have been demonstrated to improve conventional extraction procedures for several compounds in environmental, biological and clinical analysis.

While in the abovementioned approaches, the magnetic nanomaterials have been exploited in off-line modalities, there is a growing interest in developing on-line extraction procedures using magnetic nanomaterials, where the sample pretreatment step is coupled with the separation and/or detection technique. The main advantages of the on-line procedures rely on reduced analysis times and minimized sample handling, since samples can be directly processed. Furthermore, sensitivity and selectivity can be also improved. However, the challenge to be addressed in on-line devices is focused on the implementation of a magnetic field source.

In this context, several efforts have been made to develop on-line pretreatment techniques using magnetic nanomaterials, mainly in-capillary electrophoretic methods [18] and in-tube SPME (IT-SPME) [19,20] coupled to chromatographic techniques (Magnetic-IT-SPME). In the first approach, the magnetic field, supplied by permanent magnets nipped to the capillary, is used to generate a NPs coating on the surface of a capillary column, so the column efficiency is improved due to the large surface area of nanoparticles. The second approach is based on the functionalization of a capillary column with silica supported magnetic NPs. The capillary column, placed on a magnetic coil, is then used as the loop of the injection valve of a Capillary LC (CapLC). The main feature of this

system is that the adsorption is not only governed by the surface area of the capillary column, but also the magnetic field plays an important role in the extraction efficiency and preconcentration, particularly for diamagnetic compounds. The adsorption mechanism is based on the partially adsorption of diamagnetic compounds on the silica supported magnetic NPs deposited capillary, combined with the influence of a magnetic field on superparamagnetic NPs. The magnetization of these NPs inside of the capillary generates regions with different magnetic field gradients, thus, diamagnetic analytes tend to be trapped in those regions where the magnetic field is minimal, yielding to improved adsorption efficiencies. Compared to typical off-line devices, Magnetic IT-SPME can be a powerful tool in the sample pretreatment step since it takes advantage of the high surface area of magnetic nanomaterials combined with the superparamagnetic behavior of magnetic NPs to develop more efficient on-line extraction techniques. This approach has been successfully proposed for several pharmaceutical compounds [19] and organophosphorous compounds [21] in the environmental field. Nevertheless, further investigations are still needed in order to advance in the knowledge of this technique and to extent potential applications in environmental studies and in other fields.

Herein, this work is focused on the study of the adsorption behavior of triazines on SiO₂ supported Fe₃O₄ as sorbent material for magnetic-IT-SPME. A systematic study of triazines adsorption was conducted as function of the magnetic field and the relationship with triazines magnetic susceptibility. Finally, taking advantage of the enhanced adsorption properties, an analytical procedure have been developed and characterized for determining triazines in water samples.

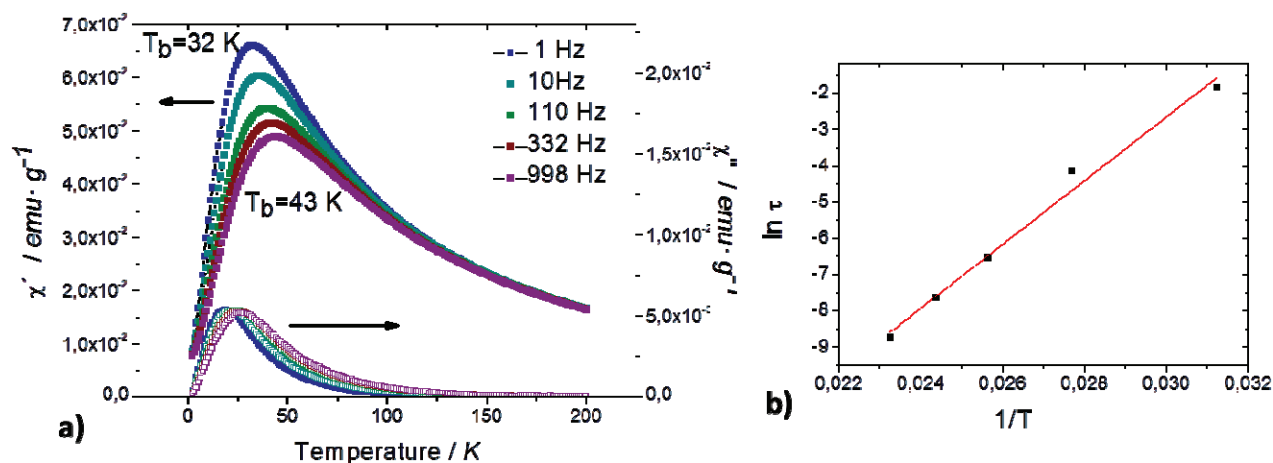
2. Results and Discussion

2.1. Magnetic Characterization of the Capillary Columns and Target Analytes

Atrazine, simazine and terbutylazine are diamagnetic analytes, so susceptible to be extracted from aqueous medium with Magnetic-IT-SPME using SiO₂ supported Fe₃O₄ deposited on the capillary column. Previous studies have reported that this sorbent nanomaterial improves the extraction efficiency of compounds such as acetylsalicylic acid, atenolol, acetaminophen, diclofenac, ibuprofen, chlorfenvinphos and chlorpyrifos [19,21]. It has been shown how this improvement is directly related with the influence of an external magnetic field on the SiO₂ supported Fe₃O₄ nanomaterial deposited on the capillary column. Fe₃O₄ nanoparticles with an average size of 5 nm and in a percentage of 5 wt.% in the silica composite (data not shown), gave rise to the synthesis of magnetic capillary column [19]. The NPs inside of the capillary column are superparamagnetic and well isolated as can be deduced of the magnetic characterization of the NPs. In order to determine the type of interaction between NPs, dynamics of superspins have been studied by *AC* magnetic susceptibility measurements in frequency range of 1–1000 Hz. Figure 1a shows the frequency dependence of the *AC* susceptibility for the Fe₃O₄ nanoparticles. As one can see, by increasing of the applied frequency, the T_B shifts to higher temperature. Relation between T_B and relaxation time (inverse of applied frequency) for non-interacting nanoparticles is given by the Neel-Arrhenius law as: $\tau = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot f} = \tau_0 e^{E_a/K_B \cdot T}$, where $E_a = KV$ is energy barrier (where K is magnetic anisotropy constant and V is the volume of nanoparticle), K_B is Boltzmann constant, $\tau = 1/f$ and τ_0 is about 10^{-9} – 10^{-13} s. Figure 1b shows the results of fitting the experimental data (real part) by the Arrhenius expression. The obtained values of

τ_0 and E_a were $2.536 \cdot 10^{-13}$ s and $E_a/K_B = 878.22 \pm 57.66$ K, respectively. As mentioned above, the value of τ_0 is about 10^{-9} – 10^{-13} s for noninteracting nanoparticles. As we expected, no strong dipole-dipole interactions are between the magnetic nanoparticles. It has been already reported that this magnetic capillary columns are formed by well isolated and superparamagnetic NPs, thus are easily magnetized under the application of an external magnetic field.

Figure 1. (a) Frequency dependence of AC susceptibility of the NPs vs. Temperature with amplitude of 17 Oe; (b) Arrhenius law fit for the nanoparticles.



By another hand, the nature of the analytes is the major factor affecting the extraction efficiency; pharmaceutical compounds showed a better enhancement of the adsorption capacity than organophosphorus compounds when a magnetic field is applied. Therefore, in a first study, the magnetic susceptibilities of the different compounds were compared. Table 1 shows the energy level calculated for each compound.

Table 1. B3LYP/6-31G** total energies (E , au) *in vacuo* and in water.

Compound	In vacuo	In H ₂ O
Acetylsalicylic acid	−648.709453	−648.720605
Acetaminophen	−515.494917	−515.507984
Diclofenac	−1665.736440	−1665.748421
Ibuprofen	−656.734267	−656.741794
Atenolol	−881.951314	−881.969818
Chlorpyrifos	−2671.570830	−2671.582537
Chlorfenvinphos	−2409.975077	−2409.986882
Simazine	−1007.990723	−1008.000696
Atrazine	−1047.309710	−1047.319747
Terbutylazina	−1086.624906	−1086.633924

Once we calculated the energy level, the magnetic susceptibilities for acetylsalicylic acid, atenolol, acetaminophen, diclofenac, ibuprofen, chlorfenvinphos and chlorpyrifos were evaluated, and these values were compared with the values for simazine, atrazine and terbutylazine. Table 2 shows the magnetic susceptibility values obtained for the studied compounds in vacuo and water. All the analytes are diamagnetic and as it was expected, there were not significant differences in the magnetic

susceptibilities. Therefore, the differences on the adsorption capacity of the magnetic adsorbent toward each compound cannot be explained by the differences in the magnetic susceptibilities of these compounds, but must be crucially depending on the polarity of each compound and the chromatographic conditions, deeply influenced by the interaction of the external magnetic field with the magnetic adsorbent [19,22].

Table 2. Isotropic diamagnetic susceptibility (IDS), isotropic paramagnetic susceptibility (IPS) and isotropic total susceptibility (ITS) ^a in au.

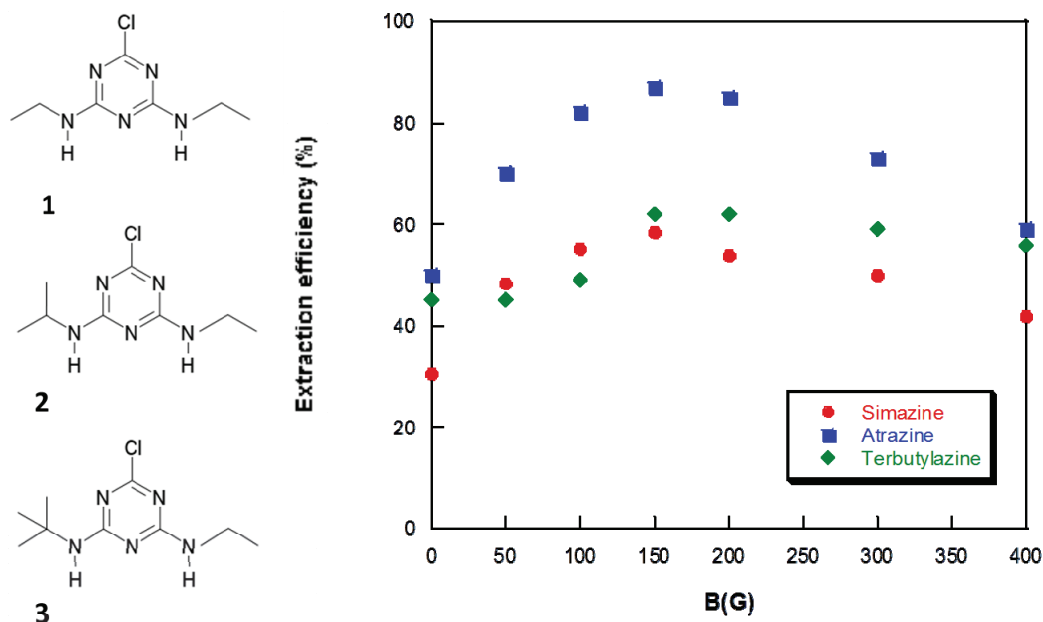
Compound	In vacuo			In H ₂ O		
	IDS	IPS	ITS	IDS	IPS	ITS
Acetylsalicylic acid	-375.1256	354.4428	-20.6827	-376.0739	355.3678	-20.7061
Acetaminophen	-361.7369	342.8417	-18.8952	-361.2246	342.2788	-18.9458
Diclofenac	-1073.6967	1037.0720	-36.6247	-1071.6524	1035.0105	-36.6419
Ibuprofen	-784.5031	754.6211	-29.8820	-784.0887	754.2092	-29.8795
Atenolol	-1895.5223	1858.5274	-36.9949	-1905.1243	1868.0617	-37.0626
Chlorpyrifos	-1070.6714	1033.9535	-36.7179	-1070.5282	1033.7223	-36.8059
Chlorfenvinphos	-1254.5588	1216.6838	-37.8751	-1257.4740	1219.5444	-37.9296
Simazine	-588.8682	563.8451	-25.0230	-591.2717	566.3096	-24.9621
Atrazine	-716.3337	688.7578	-27.5760	-717.3796	689.8408	-27.5388
Terbutylazine	-787.0130	757.0138	-29.9993	-786.0579	756.1178	-29.9401

$$^a \text{ITS} = \text{IDS} + \text{IPS}.$$

2.2. Adsorption of Triazines in the SiO₂ Supported Fe₃O₄ Capillary Column

Adsorption of simazine, atrazine and tertubylazine in the magnetic sorbent phase was studied following the procedure described in [19] with minimal modification. Typically, 100 μ L of a mixture of triazines was passed through the capillary column in the load position (see Figure 5, Experimental Section) at variable magnetic fields (from 50 to 400 G). Once the sample is processed, the injection valve is rotated to the inject position (Figure 5, Experimental Section) at the same time that the polarity of the magnetic field is changed. Then, the adsorbed analytes are transferred from the magnetic capillary column to the chromatographic system for their separation and detection. Figure 2 shows the variation of the extraction efficiency as function of the magnetic field for the three target compounds. Note that the extraction efficiencies were calculated taking into account the slope of the calibration curve when standards at different concentration level were directly injected (2 μ L) into the chromatographic system. As seen in Figure 2, the adsorption capacity increased as function of the magnetic field applied. Similar results have been reported [19,21]. These results indicated that the application of an external magnetic field induces the magnetization of Fe₃O₄ NPs inside of the capillary column, creating regions with different magnetic field gradients that depend on the intensity of the magnetic field. Under these conditions, diamagnetic analytes are inside of a paramagnetic medium, and they are submitted to repulsion forces, in such a way that analytes tend to be trapped in the minima of the magnetic field forces. This effect influenced the partitioning coefficients of the analytes in the mobile phase flow and the stationary phase with a maximum on the extraction efficiency at 150 G.

Figure 2. Variation of the extraction efficiency as function of the magnetic field for (1) simazine; (2) atrazine; and (3) terbutylazine. Injection 100 μL of a mixture of the target analytes ($30 \mu\text{g L}^{-1}$). Mobile phase: methanol:water 85:15, flow $6 \mu\text{L min}^{-1}$. $B_{\text{adsorption}} = B_{\text{desorption}}$ (reverse polarity).

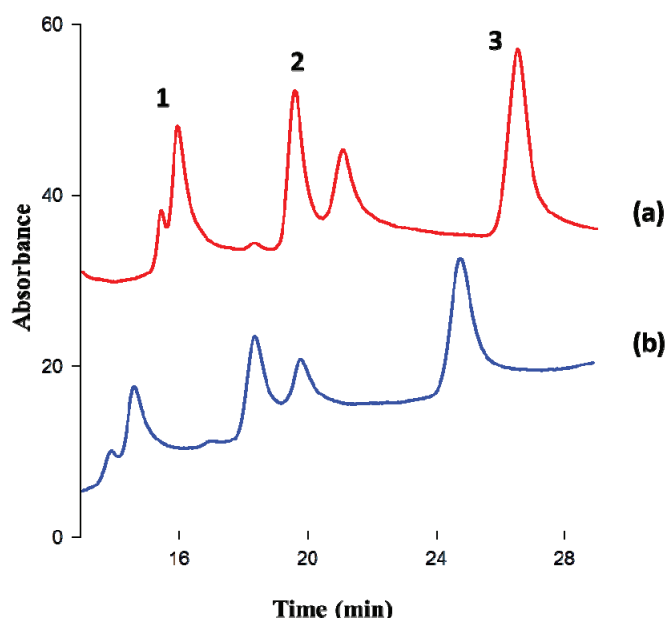


The enhancement on the adsorption led to an improvement of the extraction efficiency for simazine, atrazine and terbutylazine induced by the application of a magnetic field when the SiO_2 supported Fe_3O_4 capillary column is used. In fact, control experiments showed that in absence of a magnetic field ($B = 0 \text{ G}$), the percentage of extracted compound decreased till 30%, 50% and 45% for simazine, atrazine and terbutylazine, respectively. The mechanism by which analytes are entrapped into the sorbent material is based not only on the hydrophobic interactions between the analytes and the sorbent material, but also, on the influence of the magnetic field on the magnetic capillary column within the used configuration [19] (see Figure 5, Experimental Section).

Regardless to the adsorption capacity of the SiO_2 supported Fe_3O_4 material, it has been demonstrated that hydrophobic interactions between the analytes and the sorbent take place through the alkyl chain of CTAB that are structural units of the material [7]. In the case of Magnetic IT-SPME, a contribution of a difference force needs to be considered. Notice that the SiO_2 matrix supported the Fe_3O_4 NPs and CTAB micelles. As it was demonstrated in [7], the material is formed by two types of micelles, CTAB micelles and Fe_3O_4 -CTAB micelles and the main functions of SiO_2 matrix were to support the NPs, but also to disperse and isolate Fe_3O_4 NPs. The injected compounds in the IT-SPME device are partially adsorbed on the surface of the capillary column. When a magnetic field is applied, the Fe_3O_4 NPs embedded on the silica matrix and deposited on the surface of the capillary column, are magnetized; this magnetization yield to the formation of different magnetic field gradients on the surface of the capillary column. Under these conditions, diamagnetic compounds are strongly affected, and they tend to be trapped in the minimal magnetic field regions, increasing the adsorption capacity. Once the analytes have been adsorbed, the desorption step was carried out by changing the polarity of the magnetic field. As it was previously demonstrated, that change is necessary to generate rapid changes in the magnetic strengths, and so the analytes can be detrapped for their subsequent separation

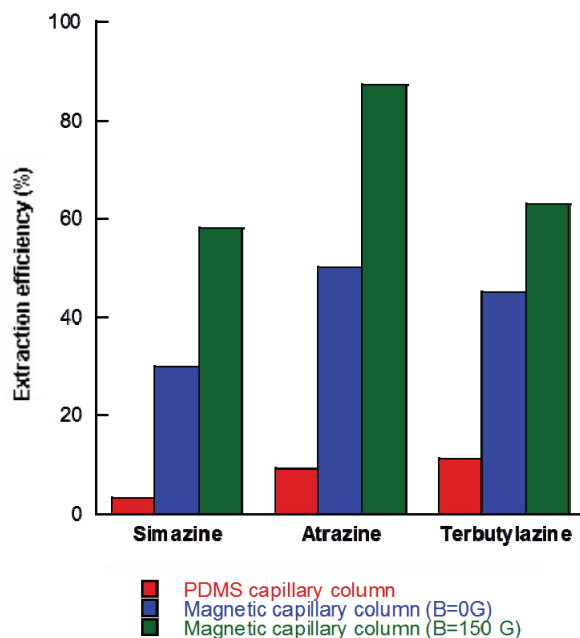
and detection in the chromatographic system. Figure 3 shows the chromatogram obtained for a mixture of triazines the magnetic capillary column applying a magnetic field (a); and without magnetic field (b). As a result of the magnetic field interaction, the analytical response of the analytes increased and the analytes eluted at higher retention times, owing to the higher adsorption of the analytes. It should be noted that unknown compounds eluted at similar retention times than simazine and atrazine, however, they were not considered interferent species since satisfactory chromatographic resolution and quantification could be carried out.

Figure 3. Chromatogram obtained with the magnetic capillary column in the Magnetic-IT-SPME device coupled with Cap-LC-DAD (230 nm); (1) simazine; (2) atrazine; and (3) terbutylazine. (a) Applying magnetic field $B_{\text{adsorption}} = 150$ G ($B_{\text{desorption}} = 150$ G, reverse polarity); (b) Without magnetic field ($B = 0$ G). Injection 100 μL of a mixture of the target analytes (30 $\mu\text{g L}^{-1}$). Mobile phase: methanol:water 85:15, flow 6 $\mu\text{L min}^{-1}$.



In an attempt to evaluate the benefits of the SiO_2 supported Fe_3O_4 material for triazines, the adsorption of triazines in a typical IT-SPME device using a commercial capillary column (polydimethylsiloxane (PDMS), TRB-5) was studied, under the same conditions (length of the capillary: 15 cm; volume of sample: 100 μL of a mixture of simazine, atrazine and terbutylazine at 30 $\mu\text{g L}^{-1}$). The extraction efficiencies for simazine, atrazine and terbutylazine were 3%, 9% and 11%, respectively. Figure 4 compares the adsorption capacity for the commercial capillary column in IT-SPME modality, the SiO_2 supported Fe_3O_4 capillary column in IT-SPME modality and the SiO_2 supported Fe_3O_4 capillary column in magnetic-IT-SPME modality. Triazines exhibited a higher adsorption on the magnetic capillary column (between 30% and 40%), compared with the typically used commercial capillary column, lower than 15%. It should be noted that these values can be even lower (0.8%–3%) when higher volumes of samples are processed. In addition, the use of the magnetic capillary column in the magnetic-IT-SPME modality even improved these results, and in some cases, such as for atrazine, the extraction efficiency was almost quantitative (87%).

Figure 4. Comparison of the extraction efficiency (%) for simazine, atrazine and terbutylazine with a TRB-5 commercial capillary column, SiO₂ supported Fe₃O₄ capillary column without magnetic field ($B = 0$ G) and with the SiO₂ supported Fe₃O₄ capillary column applying magnetic field ($B_{\text{adsorption}} = 150$ G, $B_{\text{desorption}} = 150$ G, reverse polarity).



Moreover, the magnetic capillary column also exhibited a good stability for its use in on-line devices. Fe₃O₄ NPs were stable inside of the SiO₂ matrix, since this matrix avoided NPs interaction, agglomerations and also their incorporation to the column flow [19]. In fact, the capillary column was used almost 200 times without loss in the adsorption capacity.

Taking into account the features of this methodology, some analytical characteristics were established in order to characterize the procedure. The analytical response was lineal in the working concentration interval from 3 to 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Table 3 shows the detection limit (LOD, calculated as $3S_{\text{blank}}/b$, b : slope of the calibration graph), quantification limit (LOQ) and precision values (at 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$; expressed as relative standard deviation, RSD) values for simazine, atrazine and terbutylazine, respectively.

Table 3. Detection limit (LOD), quantification limit (LOQ) and relative standard deviation (RSD) for simazine, atrazine and terbutylazine achieved with Magnetic-IT-SPME-CapLC-DAD.

Compound	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
Simazine	0.4	1.4	10
Atrazine	0.3	1.1	9
Terbutylazine	0.3	1.0	7

These results demonstrated that this methodology has direct applicability for the determination of triazines in environmental samples, such as water samples. The LODs are comparable but a little bit higher than those previously reported in the literature [23]. Note, however, that in this work, we have

processed 100 μL of samples; thus, the sensitivity can be even improved by processing higher volumes of water samples.

2.3. Application of the Magnetic Capillary Column for the Analysis of Triazines in Water Samples

Magnetic-IT-SPME-CapLC has been proposed for analytical purposes, therefore, in this section we evaluated the applicability of this methodology to analyse real water samples. For this aim, four river water samples were analyzed. The results showed that the simazine, atrazine and terbutylazine were not detected at the concentration levels assayed.

A recovery study was also carried out in order to evaluate the possible matrix effects, caused by components of the water samples. This effect was evaluated by spiking the water samples with a mixture of triazine ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$, each). The recovery values were between $99\% \pm 1\%$ and $110\% \pm 5\%$. Therefore, Magnetic-IT-SPME-Cap-LC did not show matrix effects under the optimized conditions.

3. Experimental Section

3.1. Synthesis of Fe_3O_4 NPs and SiO_2 Supported Fe_3O_4 Capillary Columns

Syntheses were carried out by the method described in [19]. $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (0.706 g, Aldrich) 1,2-hexanediol (2.013 g, Aldrich), oleic acid (1.695 g, Aldrich) and oleyamine (1.605 g, Aldrich) were mixed in 20 mL of phenyl ether (Aldrich) under Ar in order to ensure an inert atmosphere. After refluxing the mixture during 30 min at 263°C , ethanol (80 mL) was added. Then, the mixture was centrifuged and redissolved in 20 mL of hexane. Finally, water soluble NPs Fe_3O_4 -CTAB were prepared.

The silica supported Fe_3O_4 nanomaterial was synthesized using the method described earlier [19], in this procedure PEG (0.9 g) and urea (0.9 g) were dissolved in 10 mL of acetic acid (10 mM). Then, 2.5 mL of this solution were mixed with Fe_3O_4 -CTAB water dispersion (1 mL) and the pH was adjusted to 11 with NaOH (1 M). After, TEOS was added (1 mL) to the solution and stirred until a homogenous gel was obtained.

Finally, a fused silica capillary column ($id = 75 \mu\text{m}$) was pretreated with NaOH (1 M), and then the gel was injected into the capillary column. Rapidly, the capillary ends were sealed and placed into an oven. The capillary coating was achieved using the temperature program described in [19].

3.2. Physical Characterization

Magnetic characterization was carried out in a MSMS Squid Magnetometer (Quantum Design, San Diego, CA, USA) with variable temperature ($T = 2 \text{ K}$).

3.3. Instruments and Chromatographic Conditions

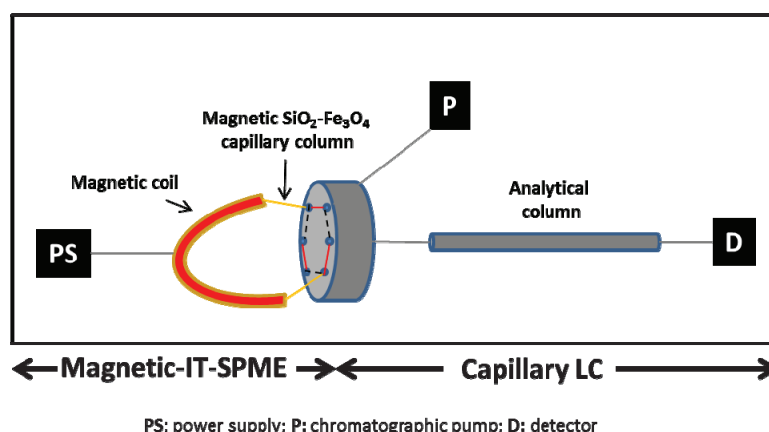
The capillary chromatographic system consisted of a liquid chromatography isocratic capillary pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) connected to a UV-Vis diode array detector 1200 series (Agilent, Waldbronn, Germany) with a 80 nL flow cell.

The separation of the triazines was carried out with a particulate column Zorbax C18 (150 mm × 0.5 mm, 3.5 μm). The mobile phase was a mixture of methanol:water 70:30 at a flow rate of 6 μL min⁻¹. All solvent were filtered through 0.45 mm nylon membranes (Teknokroma) before use.

3.4. Magnetic—IT-SPME Device

Figure 5 shows the schematic diagram of the Magnetic-IT-SPME coupled to a CapLC system. The SiO₂ supported capillary column (15 cm) wrapped with a magnetic coil, was connected to the six port injection valve of the CapLC system. The magnetic coil was connected to a power supply (PS) in order to control the magnetic field intensity. The adsorption of the analytes was carried out in the load position of the injection valve (---), 100 μL of samples were manually processed at different magnetic fields (from 50 to 400 G). Then, the analytes were desorbed and transferred to the analytical column for their separation and detection by rotating the valve to the inject position (—) at the same time that the polarity was changed [19]. After each injection, the capillary column was rinsed with 300 μL of methanol.

Figure 5. Schematic diagram of the Magnetic-IT-SPME-Cap-LC system. (---) adsorption (load position of the injection valve); and (—) desorption (injection position of the injection valve).



3.5. Computational Methods

All calculations were carried out with the Gaussian 09 suite of programs [24]. Density functional theory [25,26] calculations (DFT) have been carried out using the B3LYP [27,28] exchange-correlation functionals, together with the standard 6-31G** basis set [29]. The inclusion of solvent effects has been considered by using a relatively simple self-consistent reaction field (SCRF) method [30,31] based on the polarizable continuum model (PCM) of Tomasi's group [32–34]. Geometries have been fully optimized with PCM. The solvent we used was H₂O (common solvent in HPLC). Calculations of magnetic susceptibility using gauge including atomic orbital method (GIAO) were carried out using NMR = Susceptibility.

3.6. Analysis of Water Samples

River water samples collected from several points of the Comunidad Valenciana were analysed. They were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma) in order to remove any particulate matter, and directly processed in the Magnetic-IT-SPME-CapLC system. The analyses were carried out in triplicate.

4. Conclusions

Rapid developments on the synthesis of magnetic nanomaterials have given to the analytical nanotechnology attractive materials to improve several steps of the analytical procedure. Among them, the use of magnetic nanomaterials in the sample pretreatment step is one of most exploited, although, most of these nanomaterials have been used in off-line procedures. Herein, in this work we have demonstrated the applicability of SiO₂ supported Fe₃O₄ magnetic nanomaterial to develop an on-line extraction and preconcentration tool, Magnetic-IT-SPME, for the determination of triazines. The magnetic nanomaterial deposited on a capillary column, takes advantage of the adsorption properties of the sorbent combined with the influence of an external magnetic field on the analytes to enhance the adsorption capacity. Reduction of the analysis time and increment of the extraction efficiency are the most attractive characteristic of this analytical procedure. In addition, the use of this material in an on-line device represents a cost effective analytical methodology for the determination of triazines in environmental samples. This procedure has been successfully applied for determining triazines in the water samples.

Acknowledgments

Financial support from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Projects with FEDER cofinancing MAT2011-22785, CTQ-2011-26507, CTQ2011-26760). Generalitat Valenciana (PROMETEO, ACOMP/2013/155 and ISIC-Nano programs) is gratefully acknowledged.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors and all authors have given approval to the final version.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sivakumar, B.; Aswathy, R.G.; Sreejith, R.; Nagaoka, Y.; Iwai, S.; Suzuki, M.; Fukuda, T.; Hasumura, T.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; *et al.* Bacterial exopolysaccharide based magnetic nanoparticles: A versatile nanotoll for cancer cell imaging, targeted drug delivery and synergistic effect of drug and hyperthermia mediated cancer therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 885–889.

2. Guo, J.; Wang, W.L.; Wang, C.C. Magnetic colloidal supraparticles: Design, fabrication and biomedical applications. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5196–5214.
3. Savra, I.; Constantinou, D.; Marinica, O.; Vasile, E.; Vekas, L.; Krasia-Christoforou, T. Fabrication and characterization of superparamagnetic poly(vinylpyrrolidone)/poly(L-lactide)/Fe₃O₄ electrospun membranes. *J. Magn. Magn. Mater.* **2014**, *352*, 30–35.
4. Coronado, E.; Marti-Gastaldo, C.; Navarro-Moratall, E.; Ribera, A.; Tatay, S. Illustrating the processability of magnetic layered double hydroxides: Layer-by-layer assembly of magnetic ultrathin films. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 6214–6222.
5. Abellan, G.; Busolo, F.; Coronado, E.; Marti-Gastaldo, E.; Ribera, A. Hybrid magnetic multilayers by intercalation of Cu(II) phthalocyanine in LDH host. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 15756–15764.
6. Liu, J.; Pearce, C.I.; Liu, C.X.; Wang, Z.M.; Shi, L.; Arenholz, E.; Rosso, K.M. Fe_{3-x}Ti_xO₄ nanoparticles as tuneable probes of microbial metal oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8896–8907.
7. Moliner-Martinez, Y.; Ribera, A.; Coronado, E.; Campins-Falcó, P. Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2276–2283.
8. Liu, Y.; Yuan, M.; Qiao, L.J.; Guo, R. An effective colorimetric biosensor for glucose based peroxidase-like protein-Fe₃O₄ and glucose oxidase nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 391–396.
9. Kumar, E.R.; Jayaprakash, R.; Devi, G.S.; Reddy, P.S.P. Synthesis of Mn substituted CuFe₂O₄ nanoparticles liquefied pretroleum gas sensor application. *Sens. Actuators B* **2014**, *191*, 186–191.
10. Crosswhite, M.; Hunt, J.; Southworth, T.; Serniak, K.; Ferrari, A.; Stiegman, A.E. Development of magnetic nanoparticles as microwave-specific catalysis for rapid, low-temperature synthesis of formalin solutions. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1318–1323.
11. Pyrzynska, K. Use of nanomaterials in sample preparation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *43*, 100–108.
12. Zhang, Y.; Kuang, M.; Zhang, L.J.; Yang, P.Y.; Lu, H.J. An accessible protocol for solid-phase extraction of N-linked glycopeptides through reductive animation by amine-functionalized magnetic nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5535–5541.
13. Wang, Y.X.; Wang, S.H.; Niu, H.Y.; Ma, Y.R.; Zeng, T.; Cai, Y.Q.; Meng, Z.F. Preparation of polydopamine coated Fe₃O₄ nanoparticles and their application for enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1283*, 20–26.
14. Lasarte-Aragones, G.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction with extractant removal by magnetic nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *807*, 61–66.
15. Shi, Z.G.; Zhang, Y.F.; Lee, H.K. Ferrofluid-based liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7311–7315.
16. Zhang, J.H.; Li, M.; Li, Y.B.; Li, Z.Y.; Wang, F.F.; Li, Q.; Zhou, W.F.; Lu, R.H.; Gao, H.X. Application of ionic liquid supported magnetic dispersive solid-phase microextraction for the determination of acaricides in fruit juice samples. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 3249–3255.

17. Alcudia-Leon, M.C.; Lucena, R.; Cardenas, S.; Valcarcel, M. Magnetically confined hydrophobic nanoparticles for microextraction of endocrine-disrupting phenol from environmental samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 2729–2734.
18. Zhu, Y.; Zhou, C.; Qin, S.; Ren, Z.; Zhang, L.; Fu, H.; Zhang, W. A novel open-tubular capillary electrochromatography with magnetic nanoparticle coating as stationary phase. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 340–347.
19. Moliner-Martinez, Y.; Prima-Garcia, H.; Ribera, A.; Coronado, E.; Campins-Falco, P. Magnetic in-tube solid phase microextraction. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7233–7240.
20. Campins-Falco, P.; Coronado-Miralles, E.; Moliner-Martínez, Y.; Ribera, A.; Prima-Garcia, H. Magnetic in-Tube Solid Phase Microextraction. *Patent Application P201100823*, 23 August 2011.
21. Moliner-Martinez, Y.; Vitta, Y.; Prima-García, H.; Gonzalez-Fuenzalida, A.; Ribera, A.; Campins-Falco, P.; Coronado-Miralles, E. Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic-solid phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: Application to organophosphorous compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 2211–2215.
22. Pamme, N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* **2006**, *6*, 24–38.
23. Chafer-Pericas, C.; Herráez-Hernández, R.; Campins-Falco, P. On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography *versus* in-tube-solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for screening analysis of triazines in water samples. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 159–171.
24. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; *et al.* Gaussian 09, Revision A.1; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
25. Parr, R.G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1989.
26. Ziegler, T. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 651–667.
27. Becke, A.D.J. Density-functional thermochemistry III. The role of exact exchange. *Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
28. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
29. Hehre, W.J.; Radom, L.; Schleyer, P.v.R.; Pople, J.A. *AB initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: New York, NY, USA, 1986.
30. Tomasi, J.; Persico, M. Molecular-interactions in solution—An overview of methods based on continuous distributions of the solvent. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027–2094.
31. Simkin, B.Y.; Sheikhet, I. *Quantum Chemical and Statistical Theory of Solutions—A Computational Approach*; Ellis Horwood: London, UK, 1995.
32. Cancès, E.; Mennucci, B.; Tomasi, J. New integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032–3042.
33. Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. Initio study of solvated molecules: A new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *255*, 327–335.

34. Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 404–417.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Anexo 5.

Microextraction with phases containing nanoparticles.

González-Fuenzalida, R. A., Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Molins-Lagua, C., Herráez-Hernández, R., Jornet-Martínez, N., Campins-Falcó P.

For reprint orders, please contact reprints@future-science.com

Microextraction with phases containing nanoparticles

In this article, the state of the art of microextraction techniques that involve nanoparticles or nanomaterials (NPs) is reviewed, with special emphasis on the applications described in the biomedical field. The uses and advantages of the different types of NPs such as carbon nanotubes (either single- and multiwalled) and other carbon-based materials, metallic NPs, including gold, silver and magnetic NPs, and silica NPs are summarized. The main strategies used to modify the selectivity, extractive capacity and/or the stability of NPs through a chemical reaction are also reviewed. The potential advantages of NPs in different forms of off-line and on-line microextraction are discussed, and illustrative examples of application in the biomedical field are shown.

Microextraction refers to the volume or mass of the extracting phase used in a sample preparation procedure or assay (microliter or microgram range). This phase can be placed on different formats such as fibers, filters or other surfaces, or even can be suspended in the sample. The volume or amount of sample processed is high relative to the extracting phase and generally, the extraction of the analytes is not exhaustive. If the extracting phase is a solid or semisolid polymeric material, the technique is called SPME. This technique was introduced by Pawliszyn *et al.* in 1990 [1]. In 1996 single drop microextraction (SDME) [2] and in 1997 liquid-phase microextraction (LPME) were also proposed [3]. **Nanoparticle microextraction** refers to the case that the extracting phase contains **nanoparticles** or nanomaterials. Currently, most research is focused on the development of new extractive materials that improve both the selectivity and the extractive capacity. Ideally, new sorbents should be cost-effective and well suited for the implementation of microsized formats of extraction that reduce the consumption of the sample and solvents. They should also offer adequate stability in order to provide satisfactory reproducibility and, whenever possible, reutilization, which

is of particular importance in online devices. In this context, nanostructures such as particles, tubes, pores and others have opened up new possibilities due to their inherent properties: large surface area-to-volume ratios, easy functionalization of the surface and adequate thermal, mechanical and chemical stability. Recent reviews have reported the use of nanoparticles (NPs) in microextraction procedures [4]. These reviews discuss the type of NPs and their applications. However, it is important to address the magnetic and nonmagnetic NP-based microextraction procedures as function of their applicability in offline and online devices. Thus, in the present work the state of art of nanomaterials in microextraction applications within the bioanalytical field has been discussed, showing that substantial progress in this area can be expected in the near future, particularly in online devices.

Types of nanoparticles

There are several types of nanomaterials, both organic and inorganic that can be used for microextraction. Those materials have been used as single units, as aggregates or incorporated into a polymeric matrix; they have been immobilized onto an extraction

Rodrigo A González-Fuenzalida¹, Yolanda Moliner-Martínez¹, Jorge Verdú-Andrés¹, Carmen Molins-Legua¹, Rosa Herráez-Hernández¹, Neus Jornet-Martínez¹ & Pilar Campins-Falcó^{*1}

¹Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

*Author for correspondence:

Tel.: +34 963 543 002

Fax: +34 963 544 402

pilar.campins@uv.es

FUTURE
SCIENCE part of

fsg

Key terms

Microextraction: Extraction process used for sample preparation in which the volume or amount of the extracting phase is very small compared with the amount or volume of sample.

Nanoparticle microextraction: Microextraction process in which the extracting phase contains nanoparticles or nanomaterials. Nanoparticles can be added to the sample, like in dispersive solid-phase microextraction, or immobilized typically on a fiber, like in fiber SPME, or in the inner surface of a capillary, like in in-tube SPME.

Nanoparticles: Particles with at least one dimension in the nanometer size range (less than 100 nm). In the context of their use as sorbents for microextraction, nanoparticles are typically classified as carbonaceous materials, metal/metal oxide nanoparticles, including both magnetic and silica nanoparticles.

Metallic nanoparticles: In the context of microextraction, nanoparticles of metals, mainly gold and silver or metal oxides (such as TiO₂, ZnO, ZrO₂ and others) used as sorbents for their high extractive capacity, stability and, in some cases, selectivity.

Magnetic nanoparticles: Nanoparticles that have a magnetic core, typically of Fe₃O₄, with a proper coating of (functionalized silica, a polymer). Magnetic nanoparticles are well suited for microextraction not only for their extraction capabilities but also because after extraction the particles with the retained analytes can be easily separated from the sample solution with a magnet.

Silica nanoparticles: Nanoparticles synthesized from silica, that are generally used to prepare hybrid or composite nanostructured sorbents as they can be easily functionalized through their silanol groups; examples are silica-coated magnetic nanoparticles, or silica nanoparticles coated with molecular imprinted polymers.

Carbon nanotubes: Graphite lamella sheets rolled either on a single tube (single walled carbon nanotubes) or concentric multiple walled carbon nanotubes. Carbon nanotubes (bulk or after chemical modification) are widely used as sorbent in microextraction due to their excellent adsorption capabilities for a variety of organic and inorganic compounds.

device or dispersed into the sample. From a chemical point of view, carbon-based nanomaterials are the most widely explored sorbents. However, increasing attention is being devoted to other nanostructured phases such as **metallic, magnetic and silica nanomaterials**, as well as to hybrid materials which combine the adsorption properties of two or more phases [5]. Of particular interest are materials in which the magnetic nanostructures are immobilized on different supports. Generally, magnetic particles (MPs) comprise magnetic elements such as iron, nickel, cobalt or their oxides and alloys with ferromagnetic or superparamagnetic properties. MP particles are available in a wide range of sizes from nano- to microparticles. The nanometer-sized magnetic NPs (1–100 nm) have attracted

particular interest in the scientific community due to their superparamagnetic nature, since they can be easily isolated from the matrix by using an external magnetic field, without retaining residual magnetization after its removal. Table 1 shows recent examples of the use of magnetic and nonmagnetic NPs combined with several analytical techniques for analyzing biological samples.

Nanoparticle extractions are typically performed in an offline mode, although they can also be affected online by immobilizing the extractive phase into small columns or capillaries connected to the instrument by means of a switching arrangement or in in-valve mode.

Off-line procedures**Nonmagnetic**

Carbon nanotubes (CNTs), both (single wall) SWCNTs and (multiwall) MWCNTs, are by far the most studied nanostructured phases. CNTs show excellent adsorption capabilities for a variety of organic and inorganic compounds. Retention of apolar compounds is mainly due to their ability to establish π – π interactions. This is the case of compounds with aromatic rings, which are strongly retained in CNTs (see Table 1). In addition, the surface of CNTs can be easily modified to give more selective sorbents, through the introduction of hydroxyl, carbonyl or carboxyl groups. For example, acidic oxidation leads to the introduction of some carboxylic groups which enhances the retention efficiency for charged or polar compounds, for example, through electrostatic interactions, van der Waals forces or hydrogen bonding, but maintaining the adsorptive capabilities to apolar compounds. Oxidized CNTs have been mainly used to extract metals, but they are also effective in retaining many other compounds, including basic proteins such as hemoglobin. The retention properties are highly dependent not only on the CNTs morphology but also on the nature and concentration of the substituent groups; it is also significantly influenced by the sample pH. Oxidized surfaces can be further functionalized by covalent and noncovalent modifications in order to increase the selectivity for the target compounds. Surface modification with chelating agents is the main adsorption approach used for the retention of metal ions. Functionalization is used to improve the efficiency and selectivity in the extraction of proteins. For example, modification of the surface of MWCNTs with poly-diallyldimethylammonium chloride (PDADA) results in a highly selective sorbent for acidic proteins. In general, MWCNTs show higher adsorption capacity than SWCNTs.

CNTs have been applied extensively to extract organic and inorganic analytes from a variety of matrices such as water, plasma, urine, blood, fruit

Table 1. Recent examples of the application of nanoparticle extraction to biological samples.

Type of NPs	Use (or purpose)	Type of analysis	Technique	Analyte (sample)	LOD/recovery	Ref.
Magnetically assembled antibody conjugated silica NPs	Alzheimer's disease treatment	Immunoassay	Fluorescence microscopy	Beta-amyloid peptides (saliva)	~20 pg/ml	[6]
Antibody conjugated glutathione decorated AuNPs (on sensor)	Cancer treatment	Immunoassay	Amperometry	Proteins (IL-6 and 8 tested; serum)	5 fg/ml (IL-6) 7 fg/ml (IL-8)	[7]
Aptamer-coupled AuNPs (bleaching agent of 4-nitrophenol, or methylene blue)	Field analysis and point-of-care applications	Bioassay	UV-Vis Spectrophotometry	Thrombin	91 pM (4-N) 10 pM (MB)	[8]
Fe ₃ O ₄ magnetic NPs	Multidisciplinary scientific interest	Separations, enzyme reuse	Enzyme immobilization	Amylo-glucosylase	92.8%	[9]
Magnetic and nonmagnetic multiwalled carbon nanotubes	Drugs detection	Determination	Dispersive SPE-UHPLC	Sulfonamide antibiotics (water samples)	<32 ng/l/ higher recovery for nonmagnetic	[10]
Peptide coupled AuNPs	Drugs detection	Bioassay	UV-Vis spectrophotometry	cAMP-dependent protein kinase	0.232 mU/μl	[11]
Polymer/Fe ₃ O ₄ magnetic NPs	Multidisciplinary scientific interest	Determination	Amperometry	Glucose (serum)	0.2 μM	[12]

Au: Gold; NP: Nanoparticle.

juices and oils, and the extracts obtained after treatment of solid samples, for example, biological tissues, food, soils and sediments. Concerning the analytes, most works deal with the extraction of pollutants, drugs (antidepressant, antibiotics, anti-inflammatory), proteins, peptides and metal ions. Generally, CNTs are directly added to the bulk sample. The suspension is then incubated for a time. Next, the CNTs with the retained analytes are separated by centrifugation and washed, if required. Finally, the analytes are desorbed from the CNTs surface with an appropriate solvent and collected for measurement. For immobilization of the sorbents on fibers, different strategies have been described such as immersion of the fiber into a suspension of NPs, electric deposition or sol-gel methodology.

Many investigations have been conducted to demonstrate the utility of other allotropic forms of carbon. Among them, graphene (or graphene oxide) and nanodiamonds (NDs) are probably the most widely employed in bioanalysis [13]. For example, graphene has been used to extract glutathione from human plasma. Graphene-bound silica has been employed to extract large molecular weight and phosphorylated peptides. On the other hand, NDs have been successfully used for the extraction and preconcentration of proteins, prior to the application of MALDI-ToF-MS.

Gold NPs (AuNPs) have been successfully applied particularly in the retention of organic compounds

containing thiol or amino groups (see Table 1). Such functional groups are adsorbed spontaneously onto AuNPs surface forming well-organized self-assembled monolayers. Moreover, AuNPs can be easily modified to enhance the selectivity. The target molecules can be adsorbed due to electrostatic forces, covalent bonds, hydrophobic interactions or molecular recognition. AuNPs are generally added to the sample. AuNPs have also mixed with micro-sized sorbents to take advantage of the combination or two or more mechanisms of interaction, and incorporated as fiber coatings for SPME. Several classes of compounds can be effectively adsorbed on AuNPs such as surfactants, polymers, proteins and peptides as well as aminothiols of clinical relevance, for example, cysteine, homocysteine and glutathione [14]. They also have a strong affinity for some pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metal ions, especially for mercury species.

Silver NPs (AgNPs) based materials are increasingly popular [15]. Recent works have demonstrated that they are effective in retaining a variety of organic and inorganic compounds in biological samples such as lead, proteins and peptides. Preconcentration of aromatic analytes on AgNPs was successfully used to improve the analytical recovery during the analysis of biofluids. AgNPs have also incorporated to polymeric matrices to provide bioresistivity to the sorbents. These nanomaterials have been also incorporated to fiber coatings in SPME.

NPs of TiO_2 , ZnO , ZrO_2 and Al_2O_3 have also been proposed. The main advantages of these nanostructured phases are their higher thermal, mechanical and chemical stability, and larger area to volume ratios compared with other NPs. These materials have been mainly used for metallic ions and some organic pollutants, or to prepare composites that can be used to improve stability and efficiency of fiber coatings in SPME. Some applications in which the oxides with nanostructured surface rods are directly used as fibers for SPME have been described. Another topic in recent research is the preparation of hybrid phases by functionalizing the metal oxide with a polymeric agent or by combining two or more metal oxides [4].

Silica NPs are very attractive for the synthesis of nanostructured sorbents for a number of reasons. They are inexpensive, thermally stable and they can be easily functionalized through the silanol groups [4]. Porous silica sorbents are also gaining popularity as they are suitable for the introduction of recognition sites. They can be obtained in a variety of morphologies and possess different chemical moieties for recognition through the sol-gel methodology. Another interesting approach is the employment of molecular-imprinted polymer (MIP) layer coated silica NPs, since these sorbents provide high selectivity toward the target analytes. In general, MIPs can be easily synthesized by copolymerization of functional and crosslinking monomers, in the presence of template molecules. After polymerization, these template molecules are removed leaving specific recognition cavities which can selectively rebind other template molecules according to the shape, size and chemical function.

Magnetic

Magnetic materials are classified into two categories according to the type of shell, with inorganic coating (silica-coated magnetic material or alumina-coated magnetic material) and organic coating of the magnetic core (see Tables 1 & 2). Generally, polymers or surfactants can be either chemically anchored or physically adsorbed on a magnetic core, protecting it from oxidation via formation of a single or double layer, creating a shell structure around it. Repulsive forces are created due to the presence of polymers or surfactants which balance the magnetic and the van der Waals attractive forces acting on the NPs. In core-shell type structure, the magnetic phase is the core and the polymeric phase is the shell. Surface modification of the magnetic core via silanization is a common way for particle functionalization. Silica-gel is the most prominent material for coating, concerning the mechanical and chemical stability as well as the thermal resistance under various conditions. In addition, it does not swell or strain pro-

viding high mass exchange [16–18]. Silica-coated magnetic materials present the advantages of easy surface modification and easy control of interparticle interactions. In order to improve the selectivity, silica-coated magnetic NPs can be easily formulated by attaching inorganic or organic molecules to their surface. In case of organic molecules, the functionalization takes place via chemical immobilization or physical adsorption. The modified silica surface can be used for effective and selective retention of metal ions. The hydroxyl groups on the iron oxide NPs surface reacted with the alkoxy groups of the silane molecules leading to the formation of Si–O bonds and leaving the terminal functional groups available for further immobilization of other molecules. In general, the behavior of silica-coated magnetic NPs is related to the thickness of their respective silica shells. The 3-aminopropyltriethoxysilane (APTEOS), p-aminophenyltrimethoxysilane (APTS) and mercaptopropyltriethoxysilane (MPTES) agents are mostly employed for providing the amino and sulfhydryl groups, respectively. While using alkoxysilanes is a very useful approach to start NPs functionalization, a drawback accompanied by its reaction route is the presence of some remaining silanol groups in the product owing to the incompleteness of the dehydration reaction. Many applications have been described in the bibliography related to silica-coated magnetic NPs [17]. Another suitable modification concerns the use of surfactants (CTAB) which can be chemically anchored or physically adsorbed on the surface of NPs [19]. In this context, mixed hemimicelles-based silica-coated magnetic NPs were proposed. In Table 2 some of these works applied to biological samples are summarized. Some figures of merit of the procedures are also given in this table.

The participation of magnetic materials in MIPs is in progress in the field of analytical chemistry owing to MIPs' advantages like high selectivity for target elements, low cost, excellent reusability as well as high stability in extreme chemical and physical conditions. Magnetic molecular imprinted NPs are suitable for separation of biomacromolecules, especially for the removal of high abundance of proteins in proteomics [21]. Other alternative proposed to enable a selective extraction of target compounds is the use of the silica coating, which can be functionalized with organosilanes and/or affinity ligands. Other types of magnetic NPs are those based in carbon-based nanomaterials, such as graphene, fullerenes, and CNTs.

Besides the dispersive solid-phase extraction (MSPE) format, which comprises direct addition to the NPs to the sample, other formats such as SPME based on a glass tube coated with magnetic NPs have been employed.

Table 2. Applications of off-line procedures using magnetic nanoparticles for the analysis of biological samples.

Analyte	Sample	Coating	Technique	Sample volume (ml)	Recoveries (%)	LODs (ng/l)	Ref.
Pb, Cd, Cu	Human hair	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /Schiff base	ICP-OES	350	97.8–102.9	120–190	[16]
PAHs	Urine	Fe ₃ O ₄ /TEOS/Diphenyl	GC-MS	0.8	81–93	0.04–0.39	[20]
Tramadol	Urine	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /polyaminoimide homopolymer and TRA as template	UV-Vis	20	96.1–100.1	1500	[21]
Puerarin	Rat plasma	Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -C ₁₈	HPLC-UV	0.2	93.6–95.3	0.01	[17]
Fenitroton	Human plasma and urine	Fe ₃ O ₄ /poly(styrene-divinylbenzene)	UV-Vis	70	98.5–101.5	500	[18]
Mefanamic acid	Urine Plasma	Fe ₃ O ₄ /CTAB	HPLC-UV	2 ml diluted to 200 ml	96–103 89–99	87 97	[19]

CTAB Cetyl trimethyl ammonium bromide; ICP-OES Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbons; TEOS: Tetraethyl orthosilicate.

On-line procedures

In general, on-line microextraction procedures integrate the sample extraction, preconcentration and in some cases, the injection, in one single step. It means that the analytical procedure is automated and samples can be directly processed. Herein, the analysis is carried out in shorter times and with less sample handling. In addition, selectivity and sensitivity can also be improved. These features are specially required when complex matrices, such as biological samples are being analyzed. Among the existing automated microextraction approaches using NPs for biological sample analysis, in-tube solid phase microextraction (IT-SPME) have attracted wide interest.

Nonmagnetic NPs

Metal oxide NPs deposited onto the surface of a capillary column have been proposed as microextraction sorbent for IT-SPME coupled to ESI-MS and LC-ESI-MS to analyze phosphopeptides [22]. In this modality of on-line microextraction, a capillary column modified with NPs, is used as the loop of the injection valve. The extraction and preconcentration of the analytes into the capillary column are carried out by passing large volumes of sample through the capillary column until the equilibrium is reached. The presence of TiO₂ NPs in the IT-SPME device enhanced the extraction capacity of phosphopeptides from biological samples owing to their high surface area, providing low detection limits (fmol) and good enrichment factors. Therefore, sample handling and, so analysis time are reduced. Moreover, the sensitivity can also be enhanced when IT-SPME is employed. With these systems, good extraction efficiencies can be obtained, reducing the analysis time and sample handling. By way of example, the influence that NPs can provide in IT-SPME is shown in Figure 1. In this figure, the

chromatogram obtained for a PAHs mixture with a capillary column modified with NPs (polydimethylsiloxane, PDMS modified with *c*-SWNTs) is compared with the chromatogram obtained with commercial PDMS capillary column (unpublished results). As can be derived from Figure 1, we take advantage of the particular NPs features to significantly enhance the adsorption capacity of the most apolar PAHs with the on-line microextraction device.

In all these examples, the presence of NPs on the surface of the capillary columns shows the advantage of increasing the surface area of the capillary, giving rise to capillary columns with high capacity and enhanced extraction efficiencies.

On-line microextraction approaches using NPs, can be also achieved by in-capillary microextraction coupled to CE [23]. In this case, an AuNPs modified capillary is used to preconcentrate the analytes. After the preconcentration, the analytes are directly transferred to the injection vial for their separation and detection by using a second capillary. Determination of monohydroxy-PAHs in urine samples was proposed. The AuNPs capillary column minimizes the sample handling, since the extraction, desorption, separation and detection steps are integrated within the electrophoretic system.

Magnetic NPs

In the previous section, it has been highlighted that an increasing number of off-line microextraction procedures use magnetic NPs. Magnetic NPs have attracted particular attention in the development of sorbent materials for microextraction because of their paramagnetic properties and thus, they have been exploited for several applications in different fields. However, the development of on-line microextraction procedures using magnetic NPs is scarcely exploited. The goal of using

magnetic NPs for on-line microextraction procedures takes advantage of the high surface area in combination with the superparamagnetic behavior, herein; the extraction efficiency can be improved. Nevertheless, the design of these devices is not an easy issue since there are instrumental difficulties associated with the need of an external magnetic field that is integrated in the on-line system.

Zhu *et al.* have recently proposed an open tubular column coated with magnetic NPs for capillary electrokinetic chromatography (CEC) [24]. In such work, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ were absorbed onto the wall of the capillary column by applying a magnetic field using concentric cylindrical magnets around the capillary column. In this approach the extraction efficiency as well as column efficiency were enhanced by applying the magnetic field. This magnetic field increases the number of NPs adsorbed on the capillary column, and so the adsorption improvement owing the large surface area of the NPs.

In another approach, magnetic NPs have also been described as sorbent phase for magnetic in-tube solid-phase microextraction [25]. In this device the superparamagnetic behavior of NPs deposited onto the surface of a capillary column (SiO_2 supported Fe_3O_4 NPs deposited

capillary), is exploited by integrating a magnetic coil in the IT-SPME system. This approach is attractive because of the improvement of the extraction efficiency when the magnetic field is applied, yielding to quantitative extraction efficiencies, which are much more higher than those achieved with IT-SPME in the conventional modality.

Unfortunately, on-line magnetic NPs based microextraction procedures have not been described for biological samples.

Conclusion & future perspective

NP-based microextraction procedures have been successfully applied for the analysis of inorganic and organic compounds. The proposed procedures are based on the improvement of the adsorption properties that NPs can provide over the existing conventional sorbents. Additionally, this feature can be combined with the superparamagnetic properties of magnetic NPs to develop more effective and reliable microextraction techniques. The results reported with magnetic and nonmagnetic NPs shows good reproducibility and good extraction efficiencies. Nevertheless, a few applications have been described for biological samples compared with the applications in fields such as environmental analysis.

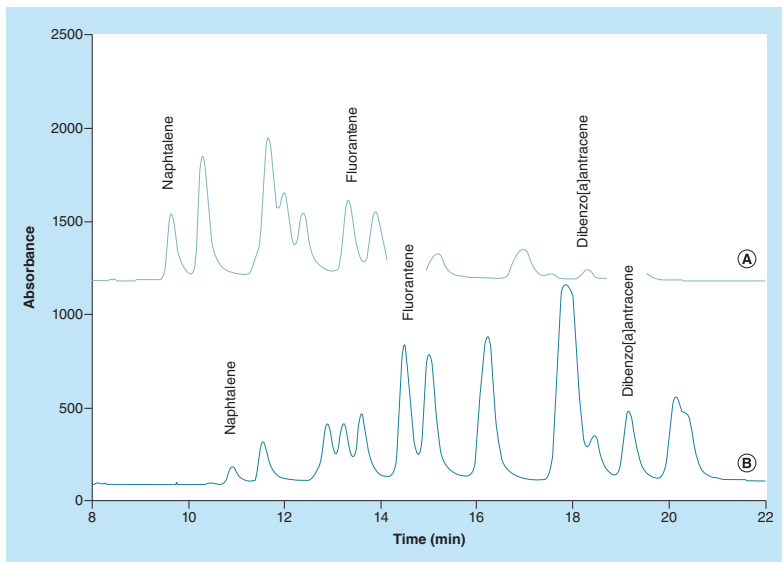


Figure 1. Chromatograms obtained for a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbon mixture (100 µg/l) with on-line-in-tube-SPME-Cap LC system. (A) With a commercial polydimethylsiloxane (TRB-35) capillary column and (B) with a c-single walled carbon nanotube modified polydimethylsiloxane (TRB-35) capillary column.

While the most widely used procedures based on the use of NPs for microextraction are off-line approaches, the development of on-line procedures is also being explored, since on-line microextraction is a powerful tool to analyze samples with rapid and sensitive approaches.

In the recent years, the combination of the advantages of the on-line microextraction procedures with the advantages of NP-based sorbents have given rise to the development of on-line NP-based microextraction procedures. In this context, carbon NPs, metallic NPs and magnetic NPs have been proposed as components of the sorbent phases for on-line microextraction devices. In fact, several successful approaches for the analysis of biological samples have been recently published. The application of on-line NP-based microextraction procedures for bioanalysis have been carried out mainly employing nonmagnetic NPs, probably due to the difficulty that the application of a magnetic

field involves in an on-line device. Therefore, further investigations in the development of on-line NP-based microextraction procedures for biological samples are still needed.

Financial & competing interests disclosure

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (project CTQ2011-26760, CTQ2014-53916-P) and to the Generalidad Valenciana (PROMETEO program 2012/045). R. González-Fuenzalida expresses her gratitude to University of Valencia for a *Atracció de talent* research contract. N. Jornet-Martínez expresses her gratitude to PROMETEO program for her research contract. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

- Nanoparticle (NP) microextraction refers to the case that the extracting phase contains NPs.
- Recent advances in the development of new extractive materials based on NPs have been performed in order to improve the selectivity and the extractive capacity.
- Organic and inorganic NPs can be used for microextraction.
- The magnetic NPs have special interest in microextraction due to its superparamagnetic properties.
- NP-based microextraction procedures have been successfully applied for the analysis of organic and inorganic compounds.
- To date most of the procedures reported on the use of NPs for microextraction are offline approaches, and some developments of on-line procedures are also being explored.
- The application of on-line-based microextraction procedures for bioanalysis have been carried out mainly by employing nonmagnetic NPs.
- NPs deposited onto the surface of a capillary column as microextraction sorbent (IT-SPME) enhances the sensitivity, and reduces sample handling and analysis time.

References

- 1 Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145–2148 (1990).
- 2 Jeannot MA, Cantwell FF. Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.* 68, 2236–2240 (1996).
- 3 He Y, Lee HK. Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. *Anal. Chem.* 69, 4634–4640 (1997).
- 4 Lasarte-Aragones G, Lucena R, Cardenas S, Valcárcel M. Nanoparticle-based microextraction techniques in bioanalysis. *Bioanalysis* 3, 2533–2548 (2011).
- 5 Tian J, Xu J, Zhu F, Lu T, Su C, Ouyang G. Application of nanomaterials in sample preparation. *J. Chromatogr. A* 1300, 2–16 (2013).
- 6 Kim CB, Choi YY, Song WK, Song KS. Antibody-based magnetic nanoparticle immunoassay for quantification of Alzheimer's disease pathogenic factor. *J. Biomed. Opt.* 19(5), 051205 (2014).
- 7 Orieno BA, Krause CE, Latus A, Chikkaveeriah BV, Faria RC, Rusling JF. On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* 53, 268–274 (2014).
- 8 Li W, Qiang W, Li J, Li H, Dong Y, Zhao Y, Xu D. Nanoparticle-catalyzed reductive bleaching for fabricating turn-off and enzyme-free amplified colorimetric bioassays. *Biosens. Bioelectron.* 51, 219–224 (2014).
- 9 Gupta K, Jana AK, Kumar S, Maiti M. Immobilization of amyloglucosidase from SSF of *Aspergillus niger* by crosslinked enzyme aggregate onto magnetic nanoparticles using minimum amount of carrier and characterizations. *J. Mol. Cat. B Enzymatic* 98, 30–36 (2013).
- 10 Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Afonso MM, Palenzuela JA, Rodríguez-Delgado MA. Comparison between magnetic and non magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples. *Talanta* 116, 695–703 (2013).

- 11 Zhou J, Xu X, Liu X et al. A gold nanoparticles colorimetric assay for label-free detection of protein kinase activity based on phosphorylation protection against exopeptidase cleavage. *Biosens. Bioelectron.* 53, 295–300 (2014).
- 12 Yang Z, Zhang C, Zhang J, Huang L. Development of magnetic single-enzyme nanoparticles as electrochemical sensor for glucose determination. *Electrochim. Acta* 111, 25–30 (2013).
- 13 Chen X, Hu L, Liu J, Chen S, Wang J. Nanoscale carbon-based materials in protein isolation and preconcentration. *Trends Anal. Chem.* 48, 30–38 (2013).
- 14 Lin JH, Tseng WL. Gold nanoparticles for specific extraction of biomolecules and environmental pollutants. *Rev. Anal. Chem.* 31, 153–162 (2012).
- 15 González-Fuenzalida RA, Moliner-Martínez Y, González-Béjar M et al. *In situ* colorimetric quantification of silver cations in the presence of silver nanoparticles. *Anal. Chem.* 85, 10013–10016 (2013).
- 16 Bagheri H, Afkhami A, Saber-Tehrani M, Khoshshafar H. Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using atomic absorption spectrometry. *Talanta* 97, 87–95 (2012).
- 17 Wang Q, Huang L, Yu P, Wang J, Shen S. Magnetic solid-phase extraction and determination of puerarin in rat plasma using C_{60} functionalized magnetic silica nanoparticles by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 912, 33–37 (2013).
- 18 Eskandari H, Naderi-Darehshori A. Preparation of magnetite/poly(styrene-divinylbenzene) nanoparticles for selective enrichment-determination of fenitrothion in environmental and biological samples, that synthesized a cross-linked nano sized spherical magnetic poly(styrene-divinylbenzene) as an adsorbent for enrichment-determination of fenitrothion in environmental and biological samples. *Anal. Chim. Acta* 743, 137–144 (2012).
- 19 Beiraghi A, Pourghazi K, Amoli-Diva M, Razmara A. Magnetic solid phase extraction of mefanamic acid from biological samples based on the formation of mixed hemimicelles aggregates on Fe_3O_4 nanoparticles to its HPLC-UV detection. *J. Chromatogr. B* 945–946, 46–52 (2014).
- 20 Bianchi F, Chiesi V, Casoli F et al. Magnetic solid-phase extraction based on diphenyl functionalization of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples. *J. Chromatogr. A* 1231, 8–15 (2012).
- 21 Madrakina T, Afkhami A, Mahmooof-Kashani H, Ahmadi M. Superparamagnetic surface molecularly imprinted nanoparticles for sensitive solid-phase extraction of tramadol from urine samples. *Talanta* 105, 255–261 (2013).
- 22 Lin B, Li T, Zhao Y, Huang FK, Guo L, Feng YQ. Preparation of a TiO_2 NPs-deposited capillary column by liquid phase deposition and its application in phosphopeptide analysis. *J. Chromatogr. A* 1192, 95–102 (2008).
- 23 Wan H, Knobel G, Wilson WB, Calimag-Williams K, Campiglia A. Gold NPs deposited capillaries for in-capillary microextraction capillary zone electrophoresis of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electrophoresis* 32, 720–727 (2011).
- 24 Zhu Y, Zhou C, Qin S et al. A novel open-tubular capillary electrochromatography with magnetic nanoparticle coating as stationary phase. *Electrophoresis* 33, 340–347 (2012).
- 25 Moliner-Martínez Y, Prima-García H, Ribera A, Coronado E, Campins-Falco P. Magnetic in-tube solid phase microextraction. *Anal. Chem.* 84, 7233–7240 (2012).

Anexo 6.

New tools for characterizing metallic nanoparticles: AgNPs, a case study.

González-Fuenzalida, R. A., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Parada-Artigues, V., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P.

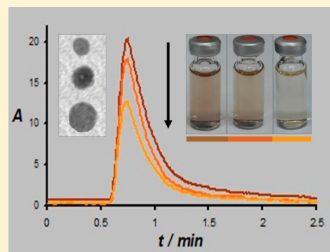
New Tools for Characterizing Metallic Nanoparticles: AgNPs, A Case Study

Rodrigo A. González-Fuenzalida, Yolanda Moliner-Martínez, Carmen Molins-Legua, Vanesa Parada-Artigues, Jorge Verdú-Andrés, and Pilar Campins-Falcó*

MINTOTA Research Group. Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Valencia, C/Doctor Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Currently, transmission electron microscopy (TEM) is the main technique for estimating the sizes of spherical nanoparticles (NPs) and through them, their concentrations. This paper demonstrates for the first time that C18 reversed-phase capillary liquid chromatography (Cap-LC) coupled to diode array detection (DAD) has the potential to estimate mean concentrations of silver nanoparticles (AgNPs) and thereby determine their average size. Direct injection of the sample without previous extraction or separation steps is carried out. Only a unique standard with a known AgNP size is needed for the calibration. In a first approach, the new method has been tested over silver nanoparticles, produced using different methods of synthesis, and their water dilutions. Good results were achieved: relative errors ranged up to 5% compared with TEM. Also stability and functionality-related NP properties, as well as nonspherical AgNPs, can be studied using this method. Moreover, by coupling online in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) to Cap-LC-DAD, the effect of the dilution can be studied as particles distribute by polarity in two groups, a distribution that responds to average particle size of not only AgNPs, but also gold nanoparticles (AuNPs). In such a distribution, the average particle size is correlated with the peak area ratio. Additionally, besides higher sensitivity and concentration-dependent signals, IT-SPME-Cap-LC responds to changes in the particle's hydrodynamic diameter allowing, for instance, the detection of cationic surfactants. Size-exclusion and hydrophobic effects are the mechanisms involved to explain this behavior.



A variety of methods has been developed to characterize and to quantify metallic nanoparticles. Microscopy (scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM)), dynamic light scattering (DLS), and microscopy-related techniques (e.g., atomic force microscopy (AFM)) are the most commonly used.

On the other hand, silver nanoparticles (AgNPs) are widely used with exponentially increasing production. Silver is known for its antimicrobial action¹ and relative low toxicity in humans.² AgNPs combine both silver and NP properties, raising the interest of understanding their behavior. Moreover, the growing use of AgNPs will increase silver exposure to the general population³ and their impact on the environment in terms of toxicity.⁴ Here lies the interest of developing or improving nanosilver analytical methods.

Microscopy has been proposed for estimating NP concentrations from the average diameter of the particles.⁵ Exclusion chromatography with UV-vis detection (SEC-UV-vis),⁶ field-flow fractionation (FFF),^{7,8} and capillary electrophoresis (CE) coupled with UV-vis⁹ or ICP-MS¹⁰ detection were also proposed.

However, in all methods of quantification previously mentioned except that of ref 8, an indirect estimation of AgNPs by means of total silver or cationic silver determination

is made. Thus, reconversion from AgNPs to Ag⁺ and/or extraction procedures such as cloud point extraction¹¹ are needed. Mudalige et al.⁸ proposed an asymmetric flow field flow fractionation method that requires functionalization strategies for enhancing nanoparticle separation and recovery. Also, if the production rate of AgNPs is not complete, the presence of free silver ions will make analysis even more complex.

Conventional HPLC studies have been made with the main objective of particle separation and silver speciation by size using tensioactive agents in the mobile phases.^{12–14} Likewise, micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) has been used,¹⁵ while Jiang et al.¹⁶ went further and successfully related signal widths of a capillary electrophoresis method to nanoparticle distributions. In all of the previously mentioned studies, detection consisted of ICP-MS, measuring Ag or Ag⁺ and so indirectly AgNPs. Here, we develop a reversed-phase capillary liquid chromatography coupled to Diode Array Detection (Cap-LC-DAD) method that responds to AgNP concentrations and so to average particle sizes (as both

Received: December 15, 2015

Accepted: December 17, 2015

Published: December 17, 2015

parameters can be mathematically related) by measuring the surface plasmon resonance band (SPRB) maximum of absorbance, a property characteristic of AgNPs.¹⁷ For assuring the silver quantitative conversion to NPs in the syntheses, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was used as a colorimetric sensor probe.¹⁸

This paper shows good correlation between Cap-LC estimations and TEM measurements, i.e. Cap-LC can be used for predicting AgNP average sizes from estimated concentrations, as opposed to the case of TEM, in which the concentrations are determined from the average sizes. As it was previously stated and for quantitative AgNPs syntheses, the NP average particle size (e.g., average diameter) can be related to AgNP concentration by adapting an equation previously used to analyze spherical gold nanoparticles.⁵ Also, nonspherical AgNP response was evaluated and although no further studies were performed with these particles, the viability of the method was confirmed. A size-exclusion mechanism as in Zhou et al.¹⁴ could explain the separation in function of NP size.

Combining IT-SPME with capillary chromatography (IT-SPME-Cap-LC)¹⁹ and using it for determining AgNPs results in peak splitting in water diluted syntheses. Explaining the results would require two mechanisms: size-exclusion and the hydrophobic effect. The ratio of the different peaks obtained could be used for characterizing synthesis with respect to the profile of sizes. Commercial AuNPs were also tested not only to confirm the hypothesis concerning the separation of the particles in the system but to demonstrate that the proposed method application can be extended to other metallic NPs. The results can be also useful for characterizing stability-related properties of the synthesized AgNPs. It should be emphasized that this approach (IT-SPME-Cap-LC) has never been used to estimate metallic NPs before.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. Reagents are shown in section 1 of the Supporting Information (SI).²⁰

AgNP Syntheses. Two methods were used to generate AgNPs: one based on silver ion reduction by sodium borohydride in the presence of citrate anions at room temperature and the other consisting of heating at high temperature a mixture of silver ions and citrate anions in glycerol–water mixtures.²⁰

Instrumentation. Instrumentation information is in section 2 of the SI.

RESULTS AND DISCUSSION

UV–vis Signal and Nanoparticle Size Relation. Most of the methods for analyzing AgNPs quantify them in terms of the amount of silver present through mass detection.^{10,12–16} Here, the surface plasmon resonance band of AgNPs was selected as measurable property (the SPRB is characteristic of a particular metallic nanoparticle¹⁷). Thus, through UV–vis spectrophotometry, AgNPs can be identified by the absorption band near 400 nm. We attempt to determine if the UV–vis signal responds to the concentration and/or to the particle size, too.

We studied two situations: AgNPs that had similar UV–vis spectra, which were measured by TEM in order to establish their size, and AgNPs that had similar sizes, measured also by TEM²⁰ and then by UV–vis spectrophotometry (figures are shown in section 4 of the SI). There was no correlation between the intensity of the absorption band and size (related

to concentration). It can be concluded that UV–vis spectrophotometry is not suitable for quantification analysis of AgNPs, as the signal responds to numerous factors (shapes, state of aggregation^{21,22}) and not directly to concentration. However, this does not mean that LC with UV–vis detection cannot be used for estimating AgNPs if a signal responding to concentration could be obtained depending on the specific chromatographic conditions.

Optimization of the Chromatographic Conditions. To evaluate the Cap-LC signal (absorption at 400 nm) dependency with AgNP concentration, the chromatographic conditions must be optimized for obtaining the highest system response. First, the synthesis blank was tested; it was prepared following Frank synthesis²⁰ without adding silver nitrate. The UV–vis spectrum is shown in Figure 1a. Absorption at 400 nm is

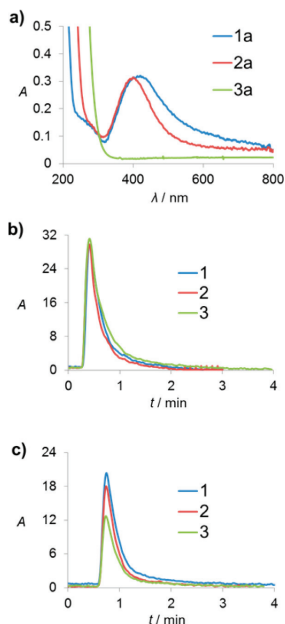


Figure 1. Optimization of Cap-LC conditions. (a) UV–vis absorption spectra of: 1:2 AgNPs diluted with (1a) water and (2a) mobile phase, (3a) the synthesis blank. Chromatograms obtained (b) without using a column and (c) with Jupiter column for (1) 12.23, (2) 13.92, and (3) 16.19 nm AgNPs in both situations.

practically zero and no chromatographic peak was obtained. The full optimization is discussed in section 5 of the SI. Particle size of the analytical column did not affect the signal, while when pore size was increased, both peak area and retention time were also increased. Jupiter C18 column was selected as it provided the best signal intensity.

The effect of the mobile phase on AgNP aggregation was studied by UV–vis spectrophotometry (Figure 1a). The mobile phase decreased aggregation (band became narrower and blue-shifted^{23,24}) making it a suitable AgNP carrier. Therefore, the dispersion state factor is minimized compared to UV–vis

analysis. Sodium dodecyl sulfate (SDS, critic micellar concentration, CMC = 8.3 mM) has the following effect in the process: Zhou et al.¹⁴ stated that surfactants are responsible for decreasing the irreversible adsorption of nanoparticles onto the column packing materials in LC.

Cap-LC Signal and Nanoparticle Size Relation. First of all, it is important to note that all the used AgNP samples were produced with quantitative synthesis rates confirmed by the TMB colorimetric method¹⁷ (assuring over 99% of yield). Consequently, the equation that relates AgNP concentration to the average nanoparticle diameter can be used correctly, as the condition of interconversion from Ag⁺ to AgNPs is satisfied.²⁰ This formula (eq 1) can be simplified and expressed as

$$d_{\text{AgNPs}} = \left(\frac{[\text{Ag}^+] \cdot d_{\text{Ag}}^3}{[\text{AgNPs}]} \right)^{1/3} \quad (1)$$

where d_{AgNPs} , d_{Ag} [AgNPs], and [Ag⁺] correspond to the average particle diameter of AgNPs, the diameter of atomic silver (0.289 nm), AgNP concentration, and initial silver (as Ag⁺ from AgNO₃) concentration, respectively. As it can be seen both AgNP parameters (d_{AgNPs} and [AgNPs]) vary inversely.

As previously mentioned, if the UV–vis signal is affected by different factors, one can expect a similar behavior for Cap-LC-DAD, as a diode array detector is used. Thus, an experiment consisting of the measurements of different sized AgNPs with and without the Cap-LC column was performed.

Different AgNPs which average particle diameter of 12.23, 13.92, and 16.19 nm²⁰ were injected with and without the Jupiter column at the optimized conditions. Figures 1b and 1c show the chromatograms obtained without or with the analytical column, respectively. When the column was employed, chromatographic signals decreased (absorbance, measurable as peak area) as the particle size increased (or calculated concentrations decreased). However, the results obtained without column were comparable to those provided by UV–vis measurements. Therefore, Cap-LC signals were proportional to AgNP concentration. These results could be elucidated by the interaction of the AgNPs with the column in a dynamic process (notably with surface charged SDS-C18 stationary phase and ionic species in the mobile phase) and pore diffusion; mainly explained by a size-exclusion mechanism as in Zhou et al.¹⁴

Cap-LC Calibration and Validation. A synthesis of AgNPs (characterized by TEM) was taken as a standard, after estimating its [AgNPs] through the d_{AgNPs} by using the previous adapted formula (eq 1). Then, an external calibration was performed with this sample and their dilutions to obtain a Cap-LC signal (peak area) versus [AgNPs] relation curve. In the next step, other AgNP syntheses were measured obtaining peak areas and through the calibration curve, the [AgNPs] (note that the dilution factor must be considered). Finally, using eq 1, d_{AgNPs} of these syntheses were calculated and compared to the ones obtained by TEM analysis.

The AgNPs sample which had an average particle diameter of 17.32 nm, was taken as standard. A 1:8 dilution of this sample resulted in 0.431 nM of AgNPs. Five different dilutions of this sample and a blank were injected in the Cap-LC-DAD system for testing linearity. No modification of the aggregation of the NPs was produced because a straight line was obtained (the calibration curve is represented in section 6 of the SI). Figure 2 shows the obtained chromatograms for a blank solution and

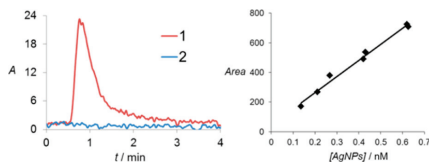


Figure 2. Cap-LC calibration results. (Left) Chromatograms for (1) 0.431 nM AgNPs and (2) blank solution. (Right) Calibration curve using the 7 different sized AgNP syntheses as standards.

0.431 nM AgNPs standard. The analytical parameters can be seen in Table 1. The detection and quantification limits were

Table 1. Analytical Figures of Merit of the Developed Cap-LC Method

R ²	slope ^a [nM ⁻¹]	LOD ^b [nM]	LOQ ^c [nM]	S _{y/x}	RSD ^d [%]	working range [nM]
0.9997	1289.7	0.015	0.051	6.35	7.7	0–0.65

^aSensitivity, based on calibration using peak area. ^bLimit of detection, 3σ-criterion. ^cLimit of quantification, 10σ-criterion. ^dRelative standard deviation N = 5, intraday.

calculated as the concentration that provided a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. Excellent linearity (R² = 0.9997), sensitivity (low LOD and LOQ), and good reproducibility (variation coefficient = 7.7%) were obtained.

Also, carryover studies were performed to ensure that no particles stayed in the system, NP sample recoveries higher than 95% were obtained. Considering on the one hand that the percentage of NPs retained in the system²² was low and constant and that on the other hand water desorbs the particles, this issue was kept under control. Therefore, in washing the system, the mobile phase was changed to 100% water between runs. The column lasted more than 100 times without significant signal loss.

Five syntheses were prepared using Frank's approach²⁰ obtaining different average particle sizes (see section 7 of the SI) by TEM and the corresponding average diameters were calculated using the ImageJ program.²⁰ The calibration working range was 0–0.646 nM, thus adequate dilutions were made for the sample concentrations to be within this range in order to measure them by Cap-LC-DAD detection.

Finally, using the previously mentioned formula, we predicted the average diameters from chromatographic-determined concentrations. Relative errors were calculated using TEM estimated diameters as mean values and ranged from 1.64% to 4.45% (Table 2), therefore our method is accurate and it has the potential to be a useful predictive tool for AgNP sizes. A new Cap-LC-DAD method has been

Table 2. Size Estimations of Different AgNPs

TEM ^a diameter [nm]	Cap-LC ^b diameter [nm]	rel. error ^c [%]	TEM ^a diameter [nm]	Cap-LC ^b diameter [nm]	rel. error ^c [%]
12.23	12.55	2.62	16.19	15.47	4.45
13.92	14.27	2.51	25.57	25.15	1.64
15.36	15.94	3.84	38.15	38.51	0.94

^aMeasured. ^bPredicted. ^cRelative error. TEM diameter was considered as the mean value.

established for predicting NP sizes from measured concentrations, performing the inverse operation of TEM analysis.

Additionally, a sample was prepared using another strategy (thermal synthesis²⁰). Larger nanoparticles were obtained (average diameter of 38.15 nm). This sample was 1:2 diluted. In this case, the relative error was below 1%. Table 2 summarizes TEM and Cap-LC analysis. Both methods provided similar results (for more details, see sections 7 and 11 of the SI).

Although the results obtained so far show a dependency between Cap-LC signal and concentration, an additional study was performed to clearly demonstrate that the system responds linearly to AgNP concentration (a complementary study is discussed in section 6 of the SI). A new calibration can be performed, but this time using as calibration points the 7 different sized syntheses previously tested (including the 17.32 nm standard synthesis). In other words, calibration points are independent of one another (and not dilutions of a same synthesis as before). From d_{AgNPs} of each synthesis, a [AgNPs] can be calculated using eq 1 and by measuring the samples, a new calibration curve was obtained. A linear response was also observed. The results are shown in Figure 2. A satisfactory coefficient of determination ($R^2 = 0.99$) was obtained.

In summary, the Cap-LC developed method responds linearly and directly to AgNP concentration and from this, indirectly to AgNP size, a property that can be mathematically related to concentration.²⁰ In addition, it is important to establish that pore size (on the same order of magnitude as the AgNP diameters) and capillary chromatography itself (where samples are not highly diluted as in conventional HPLC) both play key roles in the process allowing AgNPs to respond as previously mentioned.

Other Applications or Potential Uses of Cap-LC. Until this moment, only spherical NPs have been tested using Cap-LC. Following the KBR-based synthesis procedure of AgNPs,²⁰ triangular-shaped NPs were obtained. AgNP dispersions containing these nanoprisms are blue. The detection wavelength was changed to 600 nm corresponding to the absorbance maximum wavelength. 1:8 dilutions of this triangular-shaped AgNP synthesis were injected; results are shown in section 8 of the SI. This experiment shows that nanoprisms could also be analyzed. No further studies were done, leaving an open pathway in which promising results can be foreseen. Also stability and functionality related properties can be studied by evaluating NP Cap-LC response. The complete analysis can be seen in section 8 of the SI. AgNPs that did not give measurable signal were unstable in organic solvent and presented less ability to detect properly quaternary ammonium surfactants (here benzalkonium chloride, BZKC), both bibliographically described AgNP properties.^{17,23}

IT-SPME: AgNP-Capillaries Interactions and IT-SPME Cap-LC Signal Dependency with AgNPs Concentration. The manifold is shown in section 9 of the SI. The interaction between AgNPs and diverse matrices is a subject of intense study nowadays. When intended to be immobilized in a matrix, AgNPs tended to detach from it after a certain time.^{25,26} Considering this background information and the novelty of applying IT-SPME on AgNPs for the first time, commercial capillary polydimethylsiloxane (PDMS) columns (the most commonly used in IT-SPME¹⁹) were selected.

To evaluate the interaction between AgNPs and the PDMS capillary column, there is a variable that must be controlled: the solvent used as AgNPs dispersant, in this case water. The effect

of water on silver nanoparticles has been discussed in the literature^{17,22} suggesting that NPs can potentially change in this media. In all the Cap-LC studies previously made, considering that on the one hand no separation has taken place (i.e., only one chromatographic peak was obtained for each of the injected samples which were all in turn aqueous dilutions) and that on the other hand when calibration was performed, lineal curves were obtained (particles did not change their dispersion state, see Figure 2) with reproducible results, it can be stated that the effect of water was controlled (also, the injection volume was always the same). Notwithstanding, IT-SPME not only increases the system length, but also provides an adsorbent phase prone to interact with the NPs. Therefore, preliminary tests were made using undiluted AgNP syntheses (the final step of Frank's approach²⁰ where samples are diluted in water was avoided).

PDMS substituted with a variable percentage of polydiphenylsiloxane (TRB%) was used as adsorbent phase for IT-SPME. For preliminary tests, a 70 cm long PDMS capillary column with 35% of TRB (PDMS-TRB35) was chosen (internal volume of 56 μL). The 17.32 nm AgNP synthesis previously used as standard for the Cap-LC method was selected to perform these studies. The system flow rate was set at 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

The first test consisted of injecting increasing volumes of the unmodified 17.32 nm sample (8, 16, and 32 μL). The chromatograms are displayed in Figure 3a. For 8 and 16 μL , only one peak was obtained. When the volume was increased up to 32 μL , the signal suffered peak splitting maintaining the peak obtained for lower injected volumes and adding a new chromatographic peak, probably due to a system saturation of particles (absorbance near 1200 mAU). The DAD spectra measured for both groups corresponded to the same particles (identical SPRB profiles).

A second study was made for demonstrating that IT-SPME-Cap-LC responds to AgNPs as Cap-LC does. Equal volumes (8 μL) of 2 different sized syntheses (12.23 and 38.15 nm) were injected. The chromatogram for both samples is shown in Figure 3b as well as DAD spectra for the syntheses. IT-SPME-Cap-LC responds to concentration (further supporting evidence is presented in the following sections). On the other hand, retention times behaved as in Zhou et al.,¹⁴ proving that the size-exclusion mechanism is of primary importance.

Effect of Water and the Separation Mechanism in IT-SPME-Cap-LC. As the chosen dispersant is water and IT-SPME provides an organic medium (the adsorbent phase), several processes could occur.^{22,27} First, a sample (17.32 nm AgNPs) was 1:6 diluted with water and 30 μL of it were injected into the system. In addition, the capillary loop was filled with water and 5 μL of the unmodified synthesis (the amount of NPs was the same in both situations) were injected. Both chromatograms are shown in Figure 3c. The system provided a unique peak in the last case. However, when the sample was first off-line diluted and processed (factors such as time, light, amount of water, agitation are different to that achieved in online dilution), two peaks were obtained, and the DAD spectra of the two peaks did not exactly match in profile (spectrum B and C of Figure 3c). Water could change superficially the capping layer level in different ways^{22,28} in the off-line dilution. In this case a group of NPs became more polar (there was no system particle saturation as in the previous section).

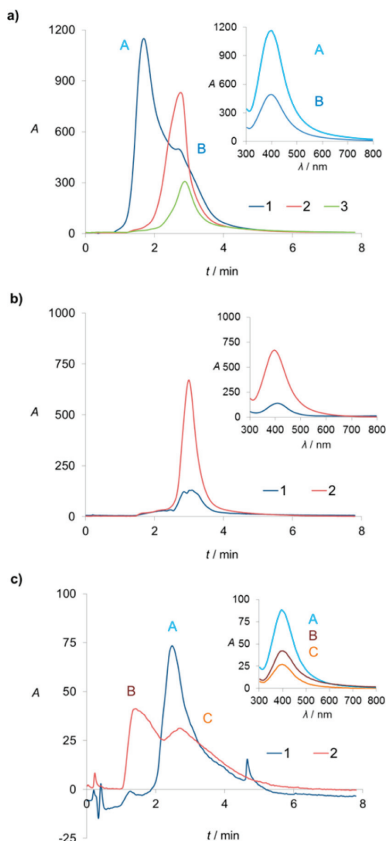


Figure 3. IT-SPME-Cap-LC-DAD preliminary studies. Chromatograms and DAD spectra (upper-right corner of the figure) for (a) 17.32 nm AgNPs with injection volumes of (1) 32, (2), 16, and (3) 8 μL ; A and B represent the signal maximum of (1) where DAD spectra were measured. (b) 8 μL of samples (1) 12.23 and (2) 38.15 nm; DAD spectra were measured at each signal maxima. (c) Sample 17.32 nm (1) directly injected in the loop filled with water and (2) injected after being diluted with water outside the system; A, B, and C represent the signal maxima where DAD spectra were measured.

The principles which explain the particle retention and the separation mechanism could be the hydrophobic effect and the size-exclusion mechanism. The hydrophobic effect²³ could be the driving force of the system: AgNPs surround themselves by the organic groups of the PDMS-TRB35 phase and remain adsorbed until the mobile phase can break this interaction. When AgNPs are diluted with water outside the system, some particles become more polar. In the following section concerning AuNPs this statement is also outlined.

Optimization of Capillary Column Length and Composition in AgNPs Aqueous Dispersions. As working with undiluted samples will give similar information to that of the previously developed Cap-LC method (except that AgNP

retention is increased and the system allows for processing of higher sample volumes), optimization must be done for aqueous dispersions of AgNPs. TRB% in the PDMS capillaries was optimized: 5% and 35% (PDMS-TRB5 and PDMS-TRB35, respectively) were tested. 20, 35, and the 70 cm long capillary columns with calculated internal volumes of 16, 28, and 56 μL , respectively, were tested. In terms of peak separation, 35 cm long PDMS-TRB35 capillary column provided the best result (see section 9 of the SI).

Not only PDMS-TRB based capillary columns were used. Capillary columns functionalized with single-walled carbon nanotubes (c-SWNTs) following the Slentz method²⁹ were tested. However, results were not as good as those obtained when PDMS-TRB based capillary columns were used in terms of AgNP signal intensity.

Size Separation and Signal Distribution. Having performed IT-SPME optimization, the next step was to test different sizes of AgNP syntheses to understand how particles distribute through the system when aqueous dispersions are involved: 12.13, 13.92, 16.19, 25.57, and 38.15 nm AgNP syntheses were injected (injection volume of 10 μL , synthesis dilution of 1:32). The results are displayed in Figure 4a and b.

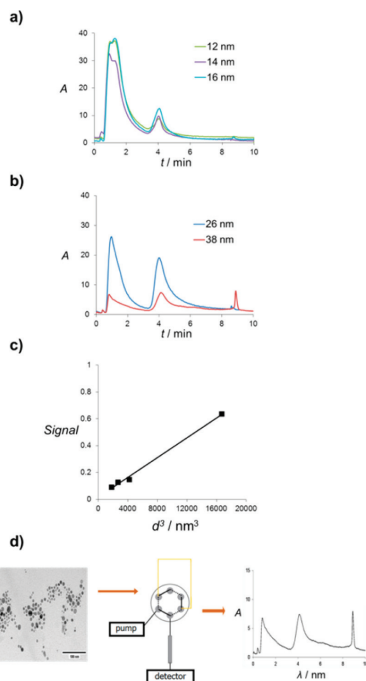


Figure 4. IT-SPME methodology. Chromatograms obtained for AgNP syntheses of average size diameter of (a) 12.13, 13.92, and 16.19 nm and (b) 25.57 and 38.15 nm. (c) Signal vs d^3 representation for AgNPs. (d) Scheme of IT-SPME-Cap-LC procedure: A given synthesis is distributed and separated into groups when flowing through the chromatographic system.

For samples of smaller particles, 2 peaks were obtained and for the synthesis of largest particles a third peak is clearly distinguished. In this particular thermal synthesis,²⁰ a group of particles must have a stronger interaction with the PDMS-TRB phase resulting in a later peak.

For studying signal distribution, the AgNP samples with two peaks were used to study the relationship between the signals of these two peaks (second peak area: first peak area, "signal"). As it can be seen in Figure 5a and b for each synthesis, the first

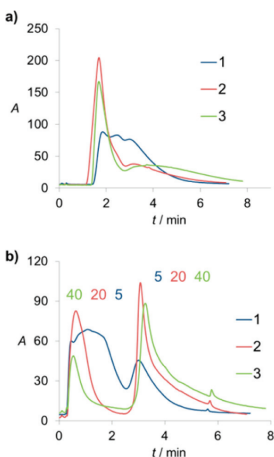


Figure 5. Obtained chromatograms at 530 nm for (a) undiluted and (b) diluted with water commercial AuNP syntheses of (1) 5, (2) 20, and (3) 40 nm.

peak (corresponding to NPs that do not interact with the adsorbent phase) is larger compared to the second peak (adsorbed NPs in SPME phase) when its size (related to d_{AgNPs}) is smaller.

It was found that the calculated ratio was proportional to the particle volume (proportional to the particle diameter cubed, d^3). The reason for considering the particle volume lies in the fact that the formula²⁰ which relates AgNP concentration and diameter was based on the assumption that the nanoparticle volume is equal to N times the volume of individual (in this case silver) atoms³⁰ (N is proportional to the particle volume, and so to d^3 , see SI²⁰). Therefore, if the analytical signal (area or ratio) responds linearly to AgNP concentration, which in turn is a function of N ,²⁰ the ratio (which can be seen as a normalized area) is expected to depend linearly to d^3 . Figure 4c shows the result of this experiment. A linear correlation ($R^2 = 0.996$) was observed. The profile of the chromatogram is characteristic of the size of NPs.

For aqueous AgNP dispersions, the considered ratio of the signals increased as the d_{AgNPs} did and there was a linear relation between this ratio and d^3 (and so, to the volume of the particles). As it was said before, the AgNP capping layer (implying a volume) can potentially change,²⁸ and it is reasonable to think that water polarizes more easily the smaller particles than the bigger ones and therefore that the first chromatographic peak is higher than the second one. Hence the IT-SPME-Cap-LC peak distribution in aqueous NP dispersions

responds to AgNP size, in addition to providing a higher sensitivity (the system injection volume is increased from 2 to 28 μL for a 35 cm long capillary column) compared to Cap-LC, IT-SPME-Cap-LC also allows one to study the dispersant effect in AgNP syntheses (a scheme of the procedure is presented in Figure 4d).

IT-SPME-Cap-LC Calibration. Using the 17.32 nm AgNP synthesis that had been taken as the standard for Cap-LC studies, calibration was performed. For this synthesis, two peaks were obtained as expected. The ratio-between-peaks calculated for each standard dilution remained almost unchanged and equal to 0.22 ± 0.02 . This average ratio was interpolated in the curve previously obtained (Figure 4c) and a diameter of 17.70 nm was estimated (relative error of 2.19%). This result is important because the ratio between the two peaks can be seen as a characteristic parameter of each synthesis that is independent of the sample dilution for a fixed injection volume (in this case, 10 μL). This feature makes the IT-SPME-Cap-LC method suitable for fast qualitative analysis (e.g., screening): comparing sizes among different syntheses or controlling sizes in a synthesis.

Chromatograms of different levels of concentration for the AgNP standard as well as the calibration curve are shown in section 9 of the SI. The obtained analytical parameters are displayed in Table 3. Here, the sum of the two peak areas was

Table 3. Analytical Figures of Merit for IT-SPME-Cap-LC Method

analytical signal ^a	R^2	slope ^b [nm^{-1}]	LOD ^c [nm]	LOQ ^d [nm]	$S_{Y/X}$	RSD ^e [%]
total area	0.998	15980	0.00171	0.00571	91.2	6.55
first peak area	0.998	13207	0.00207	0.00691	76.4	6.04
second peak area	0.998	2807	0.00975	0.03249	17.1	10.57

^aWorking range from 0 to 0.33 nM. ^bSensitivity based on calibration using peak area. ^cLimit of detection, 3σ -criterion. ^dLimit of quantification, 10σ -criterion. ^e $N = 5$, intraday.

used as the analytical signal, although calibration can be performed by selecting either the first or the second peak signal as linearity was adequate in all cases. Comparing with the results obtained for Cap-LC calibration (Table 1), for IT-SPME-Cap-LC calibration, sensitivity increased (higher slope values), precision (RSD%), and linearity (R^2) were comparable and better LODs and LOQs were obtained. Overall, processing higher sample volumes by coupling IT-SPME to the chromatographic system not only achieved a particle distribution in aqueous dispersions, which is already valuable information, but also improved the analytical parameters of the method, notably in terms of sensitivity.

Method Extension to Spherical AuNPs. Commercial AuNPs of known sizes (5, 20, and 40 nm) were tested as reference standards in the IT-SPME-Cap-LC method to confirm the hypothesis of separation when NPs are dispersed in water.

The DAD detection allows for monitoring of the signal at 530 nm which corresponds to absorption maximum of the AuNPs. The three standards, 5, 20, and 40 nm, were injected without previous dilution (injection volumes of 5, 12, and 16 μL , respectively). The chromatograms can be seen in Figure 5a. Regarding AgNP studies, the most important mechanism is size-exclusion and the order of elution is similar to that

reported in Zhou et al.¹⁴ When the 5, 20, and 40 samples were diluted with water (1:4, 1:3 and 1:2 respectively), the same behavior as that exhibited by AgNP dispersions was observed (see Figure 5b): the particles separate into two groups (one more polar and the other more hydrophobic). The calculated ratio of signals (second peak area: first peak area) increased as the d_{AuNPs} did (ratio values of 0.4, 1.4, and 3.4 respectively). Thus, with this result, the developed IT-SPME-Cap-LC method can be extended to the analysis of other spherical NPs.

As Figure 5b shows for AuNPs, retention times slightly changed for the different sizes. For the first peak the retention time goes from bigger to smaller sizes and for the second peak probably because of the hydrophobic mechanism the behavior is inverse. It is fair to state that the phenomenon which responds to NP size is the redistribution caused by the dispersant outside the system.

Additionally, a mixture of AuNPs was analyzed. The particles of the mixture were redistributed resulting in an intermediate peak ratio. This experiment is discussed in section 9 of the SI.

Comparison with Other Techniques. DLS provides information about the distribution, polydispersity and average sizes of nanoparticles within a liquid.³¹ Here, the size of a particle (the hydrodynamic particle diameter) is estimated from its translational diffusion (D) within a fluid. Both parameters can be related through the Stokes–Einstein equation. Experimentally, samples are exposed to radiation: light is scattered differently by particles according to their sizes. The rate at which the scattered light fluctuates in time (a function of D) is registered obtaining the DSL correlogram.³² From the signal profiles, data can be obtained. The time at which the signal starts to significantly decay provides an estimation of the mean size; in addition, a steeper slope corresponds to a more monodisperse sample.³²

Two AgNP syntheses were prepared following Frank's procedure²⁰ resulting in 12.34 and 12.83 nm sizes measured by TEM, as well as 13.16 and 13.51 nm sizes predicted by IT-SPME-Cap-LC respectively, this time using IT-SPME-Cap-LC calibration (see Table 3, total area curve). The overall error of this estimation was 5.6%. TEM histograms and IT-SPME-Cap-LC chromatograms are displayed in section 10 of the SI. The next step consisted of obtaining DLS measurements for both samples. The samples were measured by DLS and the correlogram is shown in Figure 6A. The smaller sized AgNPs (1 in the figure) signal decreased first, corroborating the TEM and IT-SPME-Cap-LC measurements; at the same time, both signals were comparable, so the average particle sizes were similar. DLS predicted sizes of around 17 nm, higher than those obtained from the other techniques. This fact has been reported before in the literature³³ as in DLS, hydrodynamic diameters are estimated and not the metallic core diameter of "dried" NPs as in TEM analysis. Also, the polydispersity of the smaller sized AgNPs was lower. Again, the TEM histogram for this sample exhibited a narrower distribution (see SI).

Two other experiments were performed. First, diluted and undiluted 17.32 nm AgNPs were measured (correlogram displayed in Figure 6). The hydrodynamic diameter remained practically unchanged (it decreased less than 1 nm for the aqueous dilution). This result implies that the surface layer involved in the polarization is small and that only the IT-SPME-Cap-LC method is suitable for evaluating this effect. Additionally, the commercial AuNPs were tested (Figure 6c). As expected, the signal decays later for larger NPs and also, the correlogram profile for 5 nm showed more polydispersion.

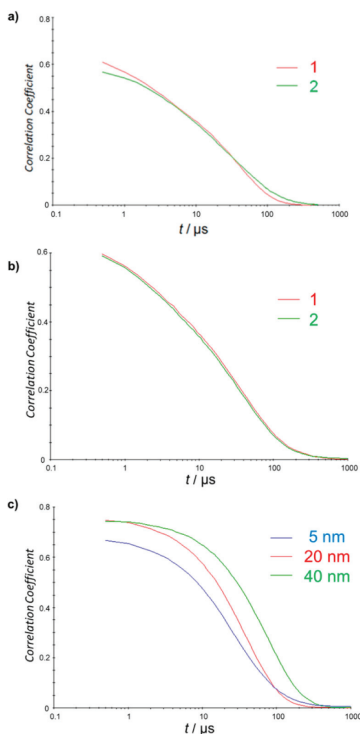


Figure 6. DLS correlograms of (a) AgNPs of (1) 12.34 and (2) 12.83 nm, (b) 17.32 nm AgNPs (1) diluted and (2) undiluted, and (c) AuNPs of different sizes.

Thus, good correlation between DLS and the proposed method was achieved.

IT-SPME-Cap-LC Dependency with the Hydrodynamic Diameter. Quaternary ammonium surfactants induce AgNP aggregation through the hydrophobic effect.²³ In a NP dispersion, if larger aggregates form, the number (and thus the concentration) of particles decreases. TEM is not a suitable technique for studying this effect as samples are dried and core sizes are analyzed. A sample of 12.23 nm AgNPs was used for this study. Undiluted samples were exposed to 30 and 100 μM of cetrimonium bromide (CTAB). The samples were injected (5 μL) and results are shown in Figure 7. IT-SPME-Cap-LC signal decreased as concentration did, while hydrodynamic diameter increased as the correlograms show. Retention times remained unchanged. Thus, our method responds to hydrodynamic size changes and can be used for detecting cationic surfactants (also BZKC was tested with similar results), classified as emerging contaminants.³⁴

CONCLUSIONS

Cap-LC and IT-SPME-Cap-LC methods for characterizing metallic nanoparticles have been successfully developed. In both approaches it has been proven that chromatographic

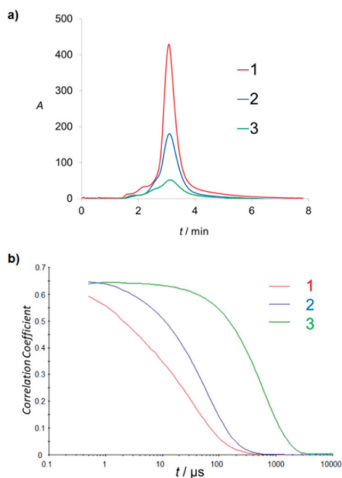


Figure 7. (a) Chromatograms and (b) DLS correlograms for 12.23 nm AgNPs in the presence of (1) 0, (2) 20, and (3) 100 μM of CTAB.

signals respond to NP concentrations. Both methods do not require sample pretreatment, extraction or separation steps and good analytical parameters were obtained. Cap-LC is a simple tool that can be used for estimating the average particle diameter of (spherical and potentially nonspherical) AgNPs syntheses as well as studying stability and functionality related properties.

IT-SPME-Cap-LC goes further. Besides increasing sensitivity, the effect of the dispersant (i.e., water) can be studied as particles in dispersions distribute according to their polarity. Unchanged NPs interact with the adsorbent phase by the hydrophobic effect, and the particles polarized by water, by size-exclusion mainly. The ratio of peaks for a given sample may be used as a characteristic parameter to quickly conceive an idea of the NP sizes (as the magnitude the effect of water is proportional to the NP size of not only AgNPs, but also AuNPs and feasibly other spherical NPs) for controlling this property in a laboratory synthesis procedure or comparing different samples. Finally, good agreement was obtained between the proposed method and DLS measurements. IT-SPME-Cap-LC also responds to the hydrodynamic particle diameter changes and could potentially be used for detecting cationic surfactants.

Both approaches are steps forward in the field of NP characterization and considering they can still be perfected, more promising results can be expected in the near future.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04751.

Experimental methods, complementary studies, TEM pictures, UV-vis absorption spectra, and chromatograms of the studied NP syntheses (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pilar.campins@uv.es. Fax: (+)34963543447.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER (projects CTQ2011-26760, CTQ2014-53916-P) and Generalitat Valenciana (PROMETEO2012/045) for the financial support received. R.A.G.-F. expresses his gratitude for a grant *Atracció Talent* to the University of Valencia.

■ REFERENCES

- Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramirez, J. T.; Yacaman, J. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353.
- Lansdown, A. J. *Wound Care* **2002**, *11*, 173–177.
- Wijnhoven, S. W. P.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Herberths, C. A.; Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; Heugens, E. H. W.; Roszek, B.; Bisschops, J.; Gosens, I.; Van de Meent, D.; Dekkers, S.; De Jong, W. H.; Van Zijverden, M.; Sips, A. J. A. M.; Geertsma, R. E. *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 109–138.
- Ju-Nam, Y.; Lead, J. R. *Sci. Total Environ.* **2008**, *400*, 396–414.
- Pacioni, N. L.; González-Béjar, M.; Alarcón, E.; McGilvray, K. L.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6298.
- Al-Somali, A. M.; Krueger, K. M.; Falkner, J. C.; Colvin, V. L. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5903–5910.
- Hasselov, M.; Lyven, B.; Haraldsson, C.; Sirinawin, W. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3497–3502.
- Mudalige, T. K.; Qu, H.; Sánchez-Pomales, G.; Sisco, P. N.; Linder, S. W. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1764.
- Lo, C. K.; Paa, M. C.; Xiao, D.; Choi, M. F. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2439–2446.
- Laborada, F.; Jimenez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J. R. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 1362.
- Chao, J. B.; Liu, J. F.; Yu, S. J.; Feng, Y. D.; Tan, Z. Q.; Liu, R. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6875–6882.
- Soto-Alvaredo, J.; Montes-Bayón, M.; Bettmer, J. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1316–1321.
- Hanley, T. A.; Saadawi, R.; Zhang, P.; Caruso, J. A.; Landero-Figueroa, J. *Spectrochim. Acta, Part B* **2014**, *100*, 173–179.
- Zhou, X. X.; Liu, R.; Liu, J. F. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 14516–14524.
- Franze, B.; Engelhard, C. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5713–5720.
- Liu, L.; He, B.; Liu, Q.; Yun, Z.; Yan, X.; Long, Y.; Jiang, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 14476–14479.
- Tang, B.; Xu, S.; Hou, X.; Li, J.; Sun, L.; Xu, W.; Wang, X. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 646–653.
- González-Fuenzalida, R. A.; Moliner-Martínez, Y.; González-Béjar, M.; Molins-Legua, C.; Verdú-Andrés, J.; Pérez-Prieto, J.; Campins-Falcó, P. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10013–10016.
- Campins-Falcó, P.; Verdú-Andrés, J.; Sevillano-Cabeza, A.; Herráez-Hernández, R.; Molins-Legua, C.; Moliner-Martínez, Y. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2695–2702.
- See the Supporting Information.
- Zhao, L. L.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7343–7350.
- Liu, J. F.; Jian, G. *Silver Nanoparticles in the Environment*; Springer, 2015.
- Zheng, L. Q.; Yu, X. D.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Talanta* **2014**, *118*, 90–95.
- Jornet-Martínez, N.; González-Béjar, M.; Moliner-Martínez, Y.; Campins-Falcó, P.; Pérez-Prieto, J. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1347–1251.
- Mitrano, D. M.; Rimmelé, E.; Wichser, A.; Ermi, R.; Height, M.; Nowack, B. *ACS Nano* **2014**, *8*, 7208–7219.

- (26) Yin, J.; Yang, Y.; Hu, Z. Q.; Deng, B. L. *J. Membr. Sci.* **2013**, *441*, 73–82.
- (27) Shen, C. W.; Yu, T. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5962–5967.
- (28) Liu, J.; Sonshine, D. A.; Shervani, S.; Hurt, R. H. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6903–6913.
- (29) Slentz, B. E.; Penner, N. A.; Lugowska, E.; Regnier, F. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3736–3743.
- (30) Hornyak, G. L.; Dutta, J.; Tibbals, H. F.; Rao, A. K. *Introduction to Nanoscience*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2008.
- (31) Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*; Oxford University Press: New York, 2001.
- (32) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Application to Chemistry, Biology and Physics*, 3rd ed.; Dover Publications, 2000.
- (33) Hasselov, M.; Readman, J. W.; Ranville, J. F.; Tiede, K. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 344–361.
- (34) Pereira, L. C.; de Souza, A. O.; Franco Bernardes, M. F.; Pazin, M.; Tasso, M. J.; Pereira, P. H.; Dorta, D. J. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 13800–13823.

Anexo 6.

Supporting Information

for

**New tools for characterizing metallic nanoparticles: AgNPs, a
case study.**

New tools for characterizing Metallic Nanoparticles: AgNPs, a case study

Rodrigo A. González-Fuenzalida, Yolanda Moliner-Martínez, Carmen Molins-Legua, Vanesa Parada-Artigues, Jorge Verdú-Andrés. Pilar Campins-Falcó*

MINTOTA research group. Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, C/ Doctor Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

*Corresponding authors: E-mail: pilar.campins@uv.es, rodrigo.gonzalez@uv.es; Fax:(+)34963543447

General Information. Experimental methods, mathematical procedures, complementary studies, optimizations as well as NPs characterization data (TEM pictures and histograms, UV-Vis spectra, Cap-LC and IT-SPME-Cap-LC chromatograms) are presented in the following sections.

Section 1. Experimental section: reagents and synthesis methods.

Reagents. Silver nitrate (>99%, Sigma-Aldrich), trisodium citrate (Guinama), potassium bromide (Sigma-Aldrich), hydrogen peroxide (Panreac), sodium borohydride (Fluka) and glycerol (Sigma-Aldrich) were used for making AgNPs. Sodium dodecyl sulfate (SDS, >99%, Merck), ammonium acetate (98%, Sigma-Aldrich) and sodium thiosulfate (Merck) were used for preparing the Cap-LC mobile phase. 5, 20 and 40 nm AuNPs in 0.1 mM PBS (phosphate buffered saline) solutions (Sigma-Aldrich) were used as reference standards. Ethanol (Romil), nitric acid (Panreac), benzalkonium chloride and cetrimonium bromide (BZKC and CTAB, Sigma-Aldrich) were used for additional tests on NPs. Water was purified through a Barnstead NANOpure II system.

AgNPs were synthesized using two different methods. The production rate of AgNPs was quantified using TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and its oxidative reaction with silver ions [1]. Free silver was not detected and thus complete conversion was achieved.

Frank's approach. Silver nanoparticles are prepared by reducing silver ions (Ag^+) with sodium borohydride in presence of citrate anions [2]. To control the sizes and shapes of the resulting particles, hydrogen peroxide can be added to the mixture [3]. Briefly, trisodium citrate (1.3 mL, 1% w/v), AgNO_3 (0.064 mL, 1% w/v), H_2O_2 (0.1 mL, 30% v/v), and optionally KBr (0.086 mL, 1 mM) and NaBH_4 (0.94 mL, 0.1% w/v) were subsequently added in a 20 mL flask and then, diluted with water to obtain a final volume of 5 mL. The reaction mixture was stirred for 15 minutes at room temperature.

Finally, the samples were stored and kept in the dark after being diluted with water (1:8 dilutions).

Changing the agitation time, the volume of water in the final dilution step and using (or not using) hydrogen peroxide as previously indicated are the factors responsible for a specific final average particle diameter [4]. When KBr was added to the mixture, triangular-shaped AgNPs were synthesized (silver nanoprisms). Otherwise, spherical nanoparticles were obtained.

Thermal synthesis. A variation of the classical Lee and Meisel method [5] which improves monodispersity was used. Briefly, a 50 ml glycerol-water mixture (40 % v/v of glycerol) was stirred in a 100 mL flask and heated up to 95° C. Then, 9 mg of silver nitrate and, one minute later, 1 ml of sodium citrate (3%) were added to the solvent mixture. The reaction mixture was stirred for 1 hour at 95°C. AgNPs were stored in a plastic centrifuge tube, once room temperature was reached.

Section 2. Reagents and Instrumentation

UV-visible spectra were registered with a Varian Cary 60 Fiber Optic UV-Vis spectrophotometer. The analytical signal was recorded between 200 and 1000 nm. AgNP characterization was performed by using a transmission electronic microscope (TEM) with a JEM-1010 from Jeol Ltd. Operated at 100 kV. TEM samples were prepared by placing a drop (~10 μ L) of the AgNP suspension (1:8 dilutions for all the sample, except 1:2 for 38.15 nm synthesis) onto a carbon-coated copper grid (300 mesh), which was subsequently dried overnight at room temperature. Silver nanoparticle sizes were calculated by using ImageJ and Histogram softwares. The concentration was estimated from TEM experiments as described in N.L. Pacioni et al. work [6]. Chromatographic studies were carried out using an Agilent Technologies High Performance Liquid Chromatography System equipped with a LC capillary binary gradient pump (Agilent 1200 Series), diode array detection and a 2 μ L injection volume valve (Cap-LC). Capillary columns of polydimethylsiloxane (PDMS) with 5% and 35% of polydiphenylsiloxane (TRB%, Teknokroma) were used for In-Tube Solid-Phase Microextraction. The water used throughout all experiments was purified through a Barnstead NANOpure II system. For DLS analysis, a Zetasizer Nano ZS (Malvern) system to measure samples directly.

Section 3. Estimation of AgNPs concentrations from TEM measurements

With TEM measurements and an equation for estimating spherical gold nanoparticles from [6], the concentration of these nanoparticles ([AgNPs]) can be estimated using the formulas below ((1) and (2)), where N represents the ratio nanoparticle:atom, and $[Ag^+]$ the silver concentration in the sample. The NP diameter (d_{AgNPs}) is an average obtained by counting a large number ($n=500$) of particles. For spherical silver nanoparticles, the number of atoms and, subsequently, concentration were calculated according to:

$$(1) N = \left(\frac{d_{AgNPs}}{d_{Ag}} \right)^3$$

$$(2) [AgNP] = \frac{[Ag^+]}{N}$$

$$(3) d_{AgNPs} = \left(\frac{[Ag^+] \cdot d_{Ag}^3}{[AgNPs]} \right)^{1/3}$$

The diameter of silver (d_{Ag}) used was 0.289 nm. Finally, the calculated $[AgNPs]$ were corrected using the corresponding dilution factors. The dilution factor was 0.125 (1:8) or 0.0625 (1:16) for the syntheses prepared by Frank's approach. Thermal synthesis was 1:2 diluted.

In the reverse process, formulas can be used for estimating the NP diameter from the Cap-LC calculated and corrected (considering the dilution) concentration as well as (see equation (3)). The concentration, in turn, is obtained from the analytical signal (peak area) using the calibration curve.

Section 4. UV-Vis signal and nanoparticle size relation

Figure S1 shows the UV-Vis spectra for AgNP syntheses which had a similar surface plasmon resonance band, SPRB (but different TEM-measured d_{AgNPs}) and similar TEM-measured d_{AgNPs} (but different SPRB). As it can be seen, no correlation between SPRB and d_{AgNPs} (which can be related to $[AgNPs]$) could be established. UV-Vis measurements cannot be used for AgNP quantification as SPRB are affected not only by size, but also by shape and NP dispersion state.

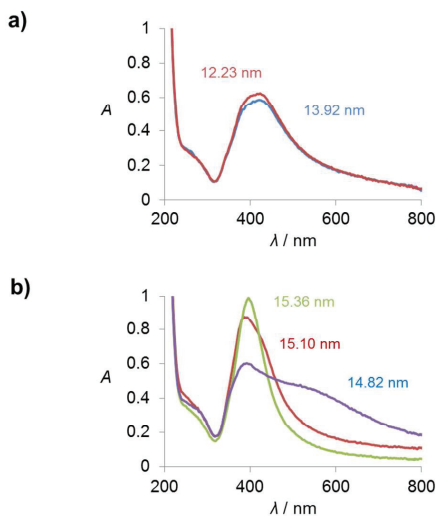


Figure S1. UV-Vis / TEM comparison. Absorption spectra of AgNPs with: (a) different and (b) similar average sizes. Cap-LC column effect.

Section 5. Optimization of the chromatographic conditions

Figure S2 shows the chromatograms for the Cap-LC column, sodium thiosulfate concentration, and flow rate optimizations.

Different reversed phase Cap-LC columns: Zirchrom (Sachtopore-RP 5 μm , 100 \AA , 0.3 mm i.d. x 10 cm), Zorbax SB-C18 (5 μm , 80 \AA , 0.5 mm i.d. x 3.5 cm), Zorbax SB-C18 (3.5 μm , 80 \AA , 0.5 mm i.d. x 3.5 cm) and Jupiter C18 (5 μm , 300 \AA , 0.5 mm i.d. x 5 cm) were tested. A 17.32 nm AgNP synthesis (measured by TEM) prepared using Frank's approach was selected for performing the optimization study. For this study, the flow rate was fixed at 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The best result was achieved when Jupiter C18 column was used (see Figure S2a).

As for sodium thiosulfate, three concentrations were tested: 0.5, 1.0 and 1.5 mM. The best signal profile was obtained for 1.0 mM in terms of peak height and width (see Figure S2b). This reagent was added to the mobile phase for eluting by complexation Ag(I) species that could interact with the SDS-modified C18 surface and thereby affect the system conditions [7]. Although in the present work cationic silver conversions to AgNPs in the prepared syntheses were quantitative (confirmed by the TMB method) and NP oxidative dissolution to Ag^+ is not frequent [8], sodium thiosulfate was kept in the mobile phase as a precaution.

The flow rate was optimized: measurements were made at 5, 10 and 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (the maximum operating value of the system pump). Chromatograms of AgNPs at the different flow rates are shown in Figure S2c. 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ was selected because the observed peak was both narrower and higher than that seen when working at 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, and more column contact, and thus a higher signal, was present relative to working at 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. For all the flow rates, DAD spectra registered at least at three positions of the chromatographic peak showed the characteristic AgNP SPRB at 400 nm.

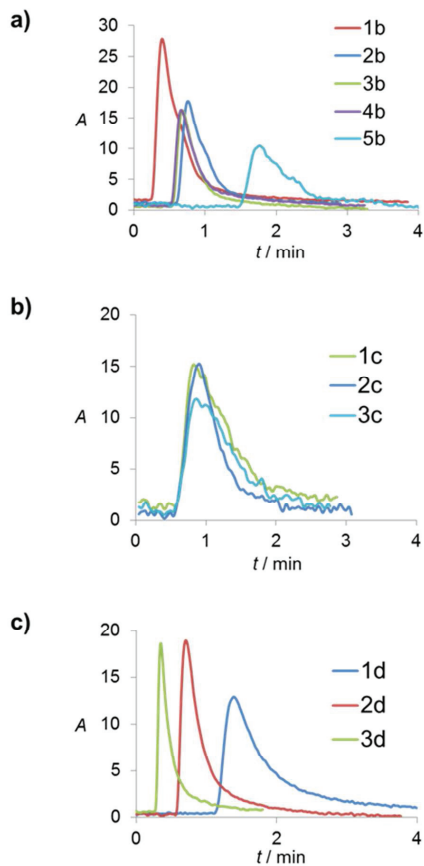


Figure S2. (a) AgNP chromatograms (1b) without and with: (2b) Jupiter column, (3b) 5 μm particle size Zorbax column, (4b) 3.5 μm particle size Zorbax and (5b) Zirchrom column. (b) AgNP Chromatograms with different $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ concentrations: (1c) 0.5 mM, (2c) 1.0 mM and (3c) 1.5 mM. (c) AgNP chromatograms at different flow rates: (1d) 5, (2d) 10, and (3d) 20 $\mu\text{L}/\text{min}$

Section 6. Calibration curve and size estimations by Cap-LC

The calibration curve obtained for the chosen standard synthesis (17.32 nm AgNPs) is shown in Figure S3 (on the left). Also, another study was carried out to prove that the Cap-LC signal responded to AgNP concentration. An Area vs [AgNPs] representation at 3 levels of concentration (0.21, 0.42 and 0.63 nM), each one containing 2 measures coming from different sized AgNPs, is represented in Figure S3 (on the right). A linear fit was obtained ($R^2 = 0.995$).

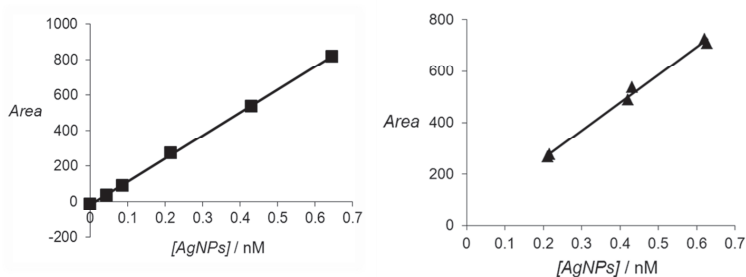


Figure S3. Representations of: (left) calibration curve for 17.32 nm AgNPs and (right) Area vs [AgNPs] plot at 3 levels of concentration (0.21, 0.42 and 0.63 nM) where each measure comes from different sized AgNP samples.

Section 7. UV-Vis spectra, TEM measurements and Cap-LC signals for AgNP syntheses:

17.32 nm Standard

Synthesis was characterized by TEM (Figure S4), UV-Vis and Cap-LC (Figure S5). It was used as calibration standard and for optimization steps. 1:8 dilution of 17.32 nm AgNPs corresponds to 0.431 nM of concentration.

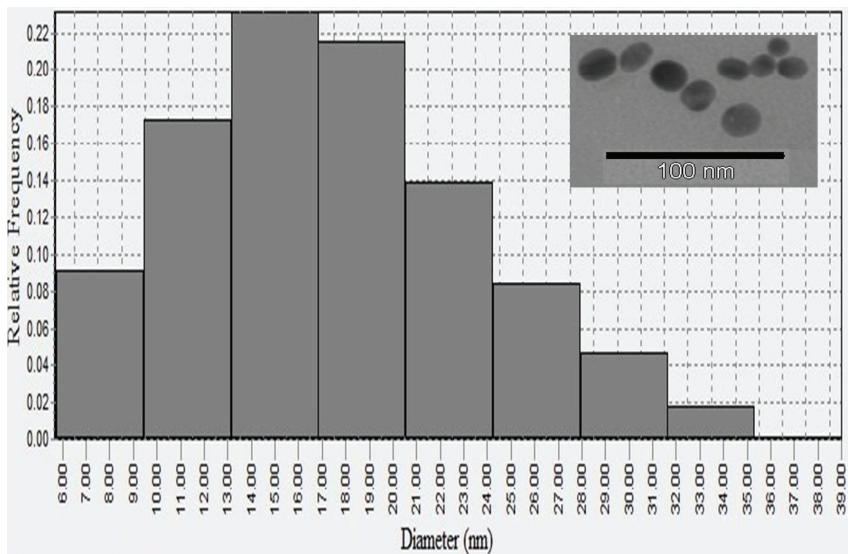


Figure S4. TEM histogram of 17.32 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

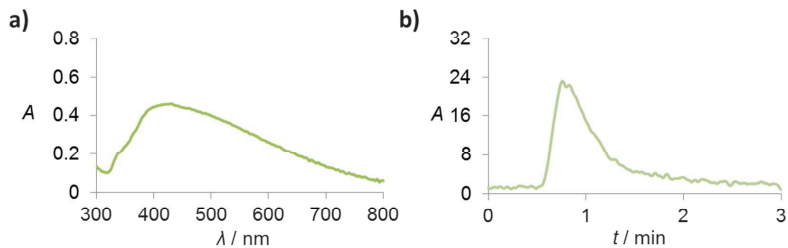


Figure S5. (a) UV-Vis spectrum of 1:8 17.32 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:8 17.32 nm AgNPs

15.36 nm Sample

Synthesis was characterized by TEM (Figure S6), UV-Vis and Cap-LC (Figure S7).

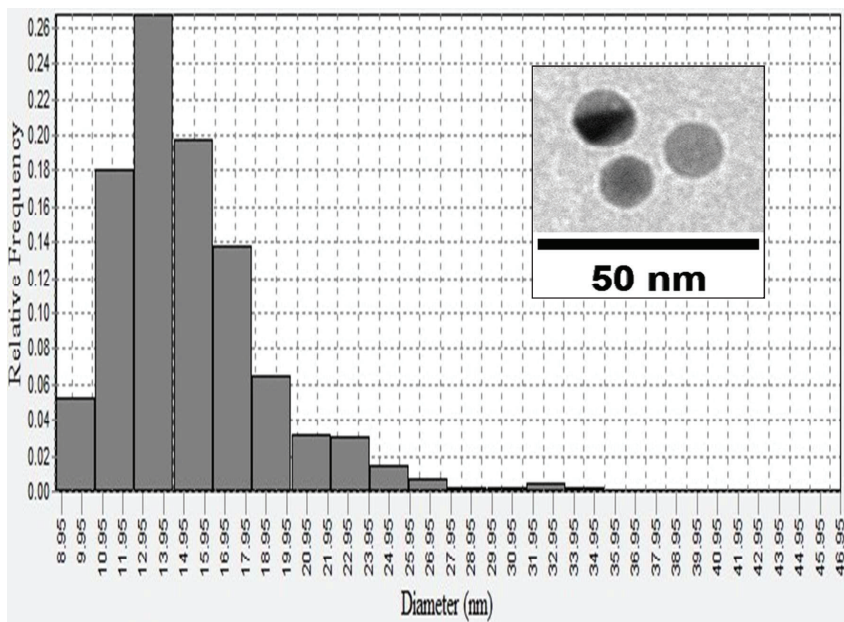


Figure S6. TEM histogram of 15.36 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

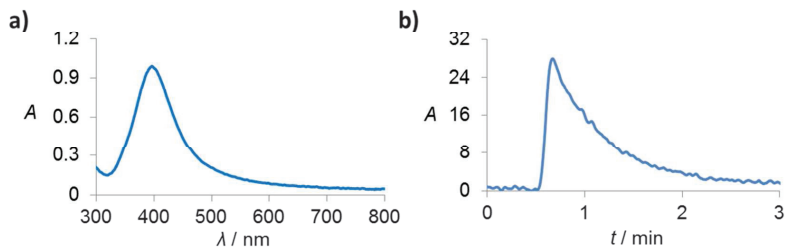


Figure S7. (a) UV-Vis spectrum of 1:4 15.36 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:8 15.36 nm AgNPs

12.23 nm Sample

Synthesis was characterized by TEM (Figure S8), UV-Vis and Cap-LC (Figure S9).

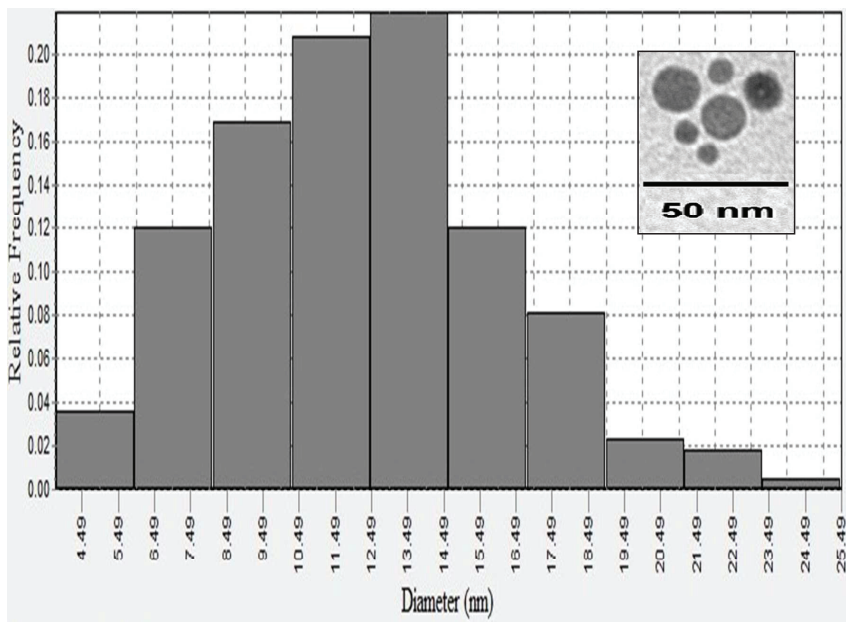


Figure S8. TEM histogram of 12.23 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

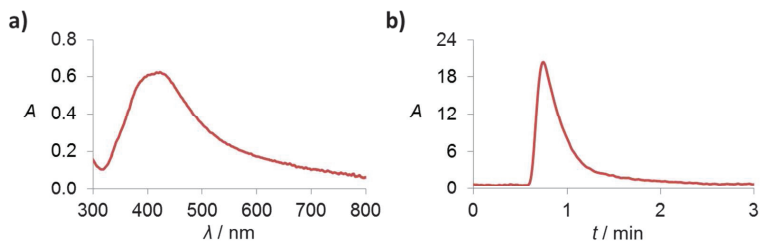


Figure S9. (a) UV-Vis spectrum of 1:8 12.23 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:16 12.23 nm AgNPs

13.92 nm Sample

Synthesis was characterized by TEM (Figure S10), UV-Vis and Cap-LC (Figure S11).

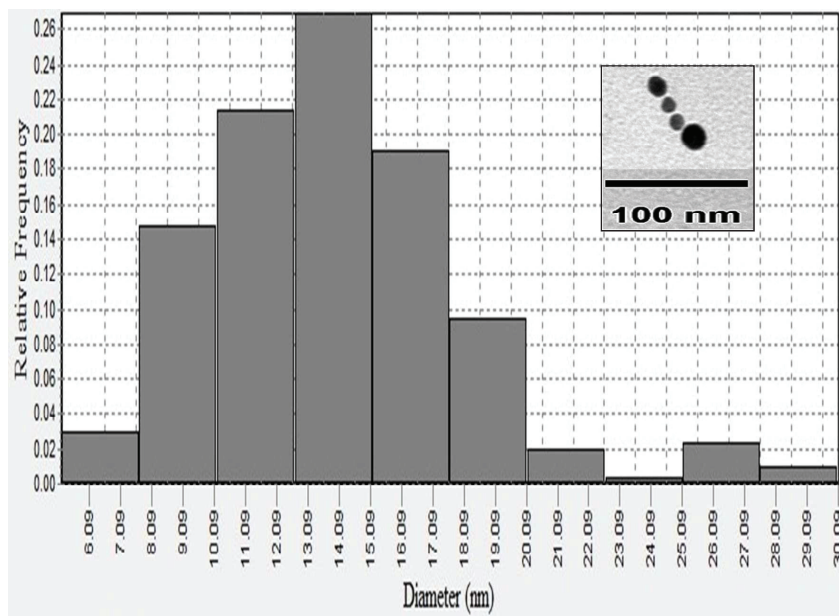


Figure S10. TEM histogram of 13.92 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

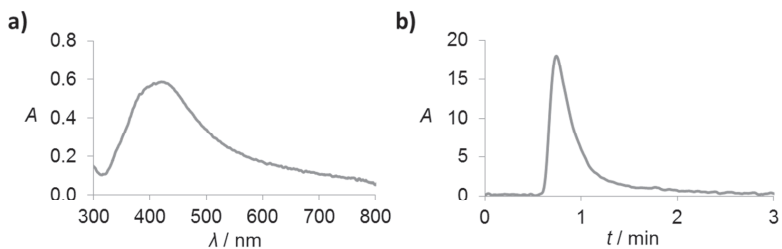


Figure S11. (a) UV-Vis spectrum of 1:8 13.92 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:16 13.92 nm AgNPs

16.19 nm Sample

Synthesis was characterized by TEM (Figure S12), UV-Vis and Cap-LC (Figure S13).

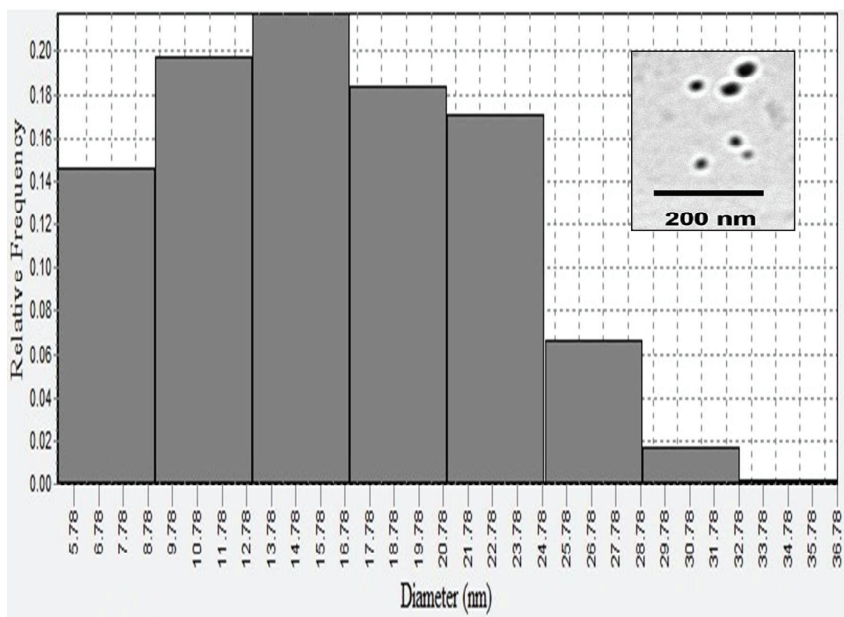


Figure S12. TEM histogram of 16.19 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

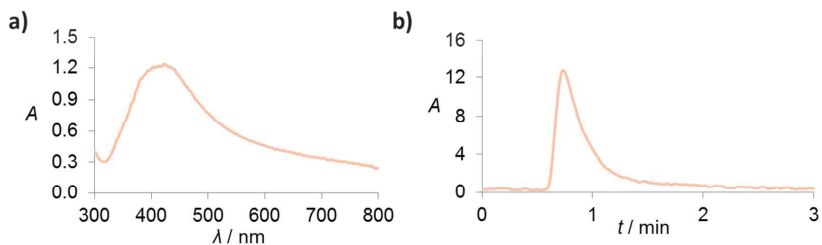


Figure S13. (a) UV-Vis spectrum of 1:8 16.19 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:16 16.19 nm AgNPs

25.57 nm Sample

Synthesis was characterized by TEM (Figure S14), UV-Vis and Cap-LC (Figure S15).

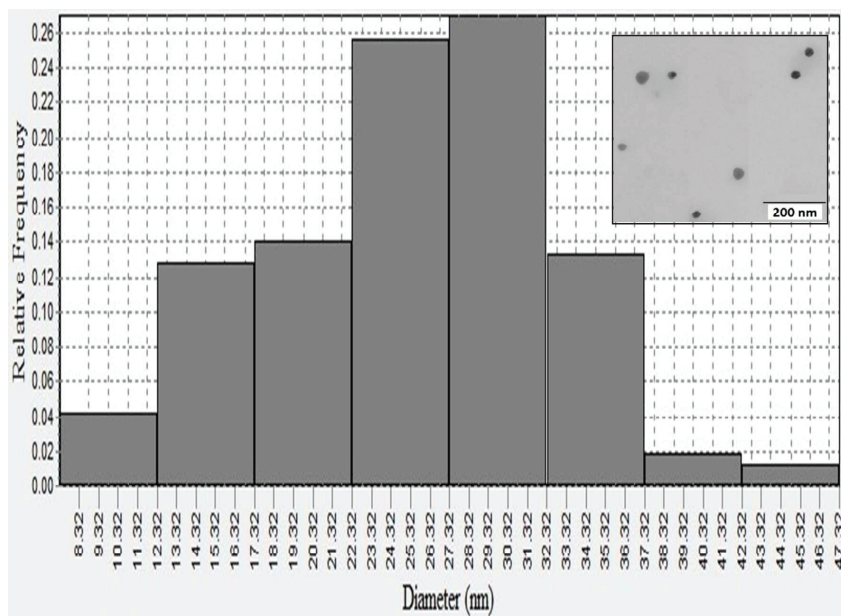


Figure S14. TEM histogram of 25.57 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

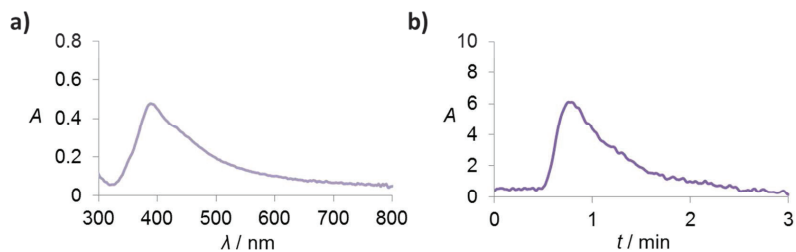


Figure S15. (a) UV-Vis spectrum of 1:8 25.57 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:8 25.57 nm AgNPs

38.15 nm Sample

Synthesis was characterized by TEM (Figure S16), UV-Vis and Cap-LC (Figure S17).

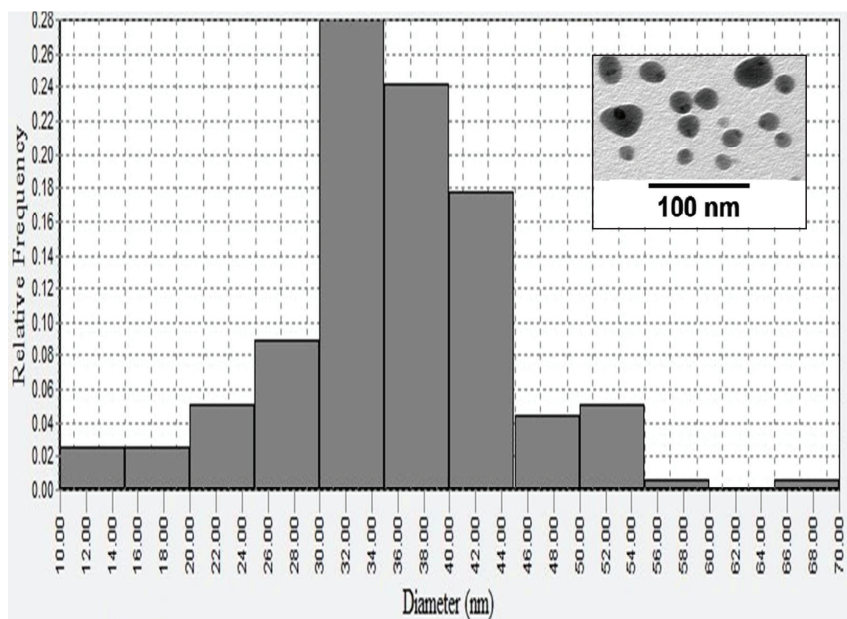


Figure S16. TEM histogram of 38.15 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture.

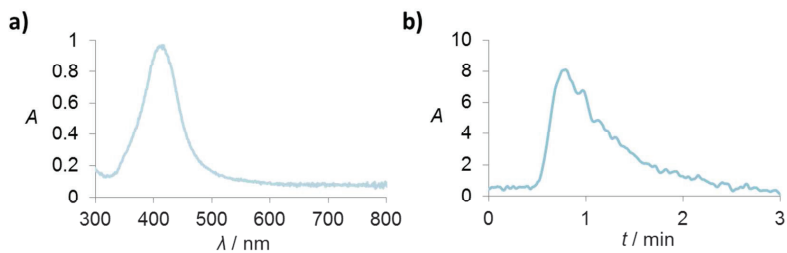


Figure S17. (a) UV-Vis spectrum of 1:15 38.15 nm AgNPs. (b) Cap-LC chromatogram for 1:2 38.15 nm AgNPs

Additional samples for reproducibility studies:

14.82 nm Sample. Synthesis characterization is shown in Figure S18.

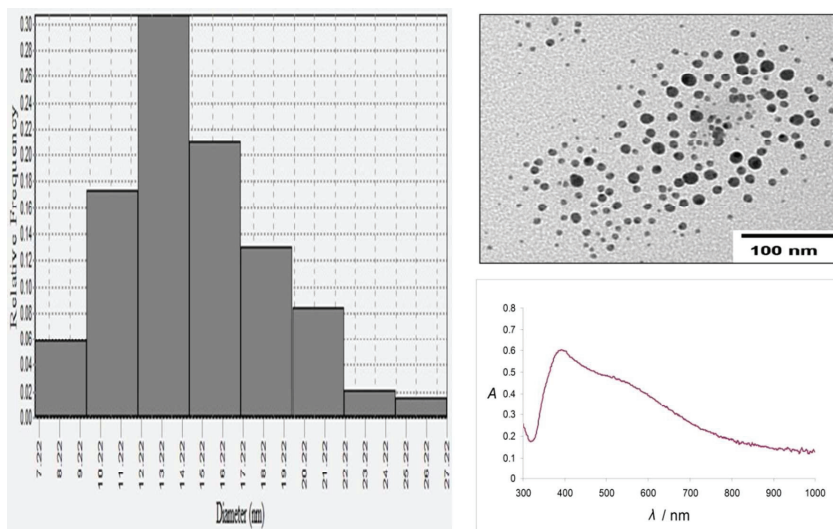


Figure S18. Left: TEM histogram showing size distributions. Up-Right: TEM image of 14.82 nm AgNPs. Down-Right: UV-Vis spectrum of 1:16 14.82 nm AgNPs.

15.1 nm Sample. Synthesis characterization is shown in Figure S19.

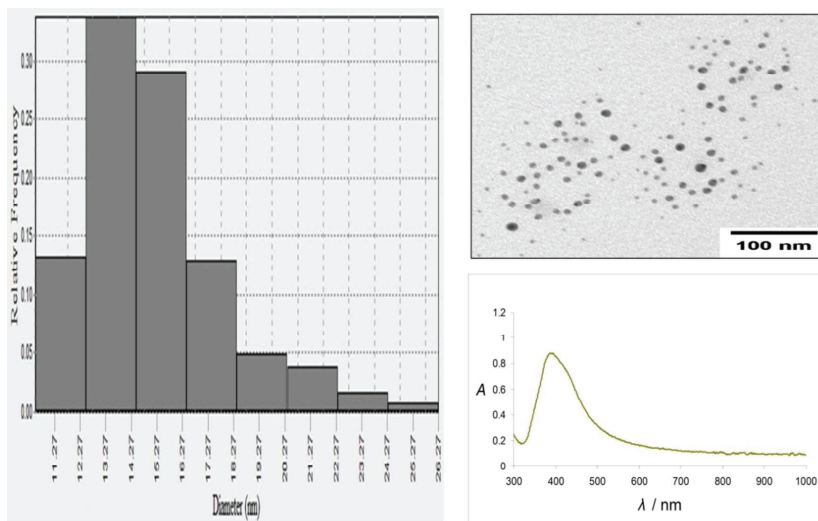


Figure S19. Left: TEM histogram showing size distributions. Up-Right: TEM image of 15.1 nm AgNPs. Down-Right: UV-Vis spectrum of 1:16 15.1 nm AgNPs.

Section 8. Non-spherical AgNPs and stability studies by Cap-LC

Following the KBr based synthesis procedure of AgNPs (described in Section 1), triangular-shaped NPs were obtained. The AgNP dispersions containing these nanoprisms are blue. The detection wavelength was changed to 600 nm corresponding to the wavelength of maximum absorbance. 1:8 dilutions of triangular-shaped AgNP synthesis were injected; results are shown in Figure S20 (Cap-LC chromatogram, UV-Vis spectrum and DAD spectrum as well as pictures are displayed in the figure). This experiment shows that nanoprisms could also be analyzed.

On the other hand, considering that NPs are subject to stress through the chromatographic system, whether unstable or degraded synthesis would respond or not using the developed Cap-LC method is still unknown. Up until the time of this writing, all the tested samples have not been damaged through time.

Under the same conditions in which 15.36 nm AgNP (previously used) synthesis was made, a new synthesis was prepared but this time adding 5% w/v sodium citrate (five times more). This reagent has a key role during the process: to be the secondary reductant and stabilizing agent [9]. It can be expected that NPs will be larger as more citrate can stabilize the particle structure. TEM analysis confirmed this prediction as the new AgNP synthesis had an average particle diameter of 16.72 nm (S2, Figure S21a). 15.36 and 16.72 nm AgNPs were tested in Cap-LC. Chromatograms are shown in Figure S21b. S2 did not respond properly in the proposed method (the predicted S2

d_{AgNPs} is larger than the one calculated by TEM). For establishing preliminary conclusions on this matter, additional tests were performed on both samples.

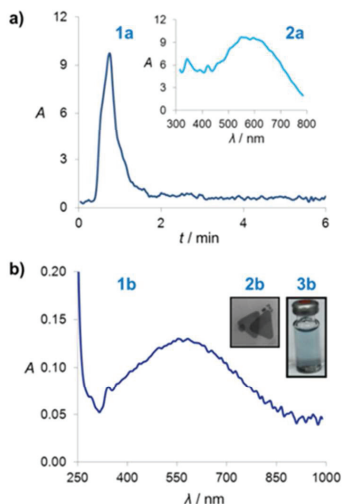


Figure S20. Non-spherical AgNP studies. (a) Cap-LC results: (1a) chromatogram at 600 nm for 1:8 AgNPs and (2a) DAD spectrum. (b) Additional data obtained: (1b) UV-Vis spectrum for 1:8 AgNPs, (2b) TEM and (2c) vial pictures of the studied non-spherical AgNPs.

It has been stated that AgNPs are stable in ethanol [10]. We used this fact to corroborate the stability (in a given organic solvent) for both syntheses, which were diluted (1:16) in water (test blank) and in ethanol. UV-Vis spectra were registered. 16.72 nm AgNPs SPRB was disrupted, while for 15.36 nm AgNPs this band remained unchanged for both solvents. Results are displayed in figure S21c. This experiment corroborates the instability observed in Cap-LC for the second synthesis.

We also assayed a functionality-related property by using a recent application of AgNPs: these particles can be used for analyzing quaternary ammonium surfactants in a colorimetric method [11]. Both samples (1:8 dilutions) were tested for detecting benzalkonium chloride (BZKC). Additions of increasing concentrations of BZKC (here in a working range from 0 to 112 μM) should induce aggregation of AgNPs (shift from yellow-orange to colorless) through the hydrophobic effect in acidic media (using diluted nitric acid). AgNP aggregation has to be gradual: if BZKC concentration increases, the hydrophobic effect and the NP aggregation are also increased. For 15.36 nm AgNPs, this tendency was verified. However, for 16.72 nm AgNPs the aggregation did not increase gradually (absorbance increased and decreased randomly). In other words, a synthesis of AgNP which is unstable in organic solvents and does not respond in the Cap-LC method cannot detect properly a quaternary ammonium surfactant. Results are displayed in Figure S21d.

To conclude, it can be said that Cap-LC gives stability-related information about AgNP syntheses (e.g. solvent stability and functionality). These parameters are difficult to quantify by microscopic techniques.

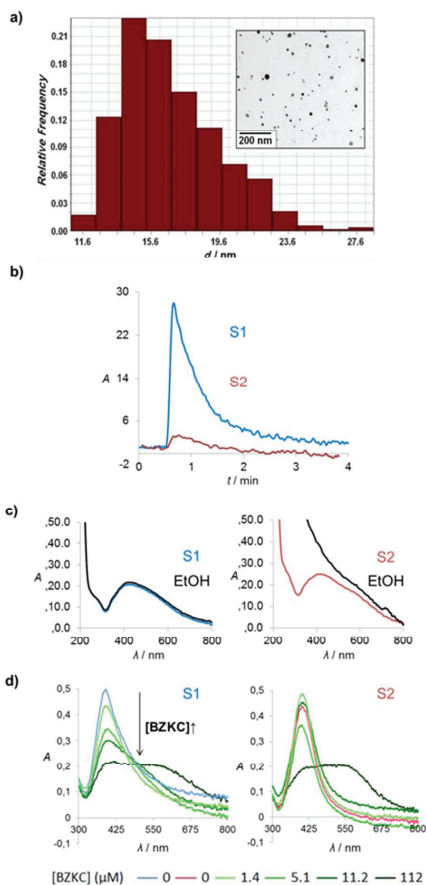


Figure S21. Synthesis stability-related studies. (a) TEM analysis: histogram of particle distribution and TEM pictures of 16.72 nm AgNPs (S2). (b) Cap-LC results for 1:8 diluted 15.36 nm (S1) and 16.72 nm (S2) AgNPs. UV-Vis experiments: (c) S1 and S2 spectra obtained for 1:16 dilutions in water (blue or red line) and ethanol (black line) and (d) S1 and S2 spectra obtained for series of samples in which BZKC was added from 0 (blue or red line) to 112 μ M (series from lighter to darker green lines). For S1, the expected variation tendency was verified and for S2 no tendency was obtained.

Section 9. IT-SPME-Cap-LC

IT-SPME-Cap-LC manifold, preliminary studies and optimization. Figure S22 shows the device employed. The IT-SPME was achieved by coupling a PDMS capillary column to the injection valve. Also, the chromatograms obtained using different PDMS capillaries (TRB-5 and TRB-35) are displayed. The PDMS TRB-35 column provided the best results in terms of intensity and peak separation for AgNP aqueous dispersions.

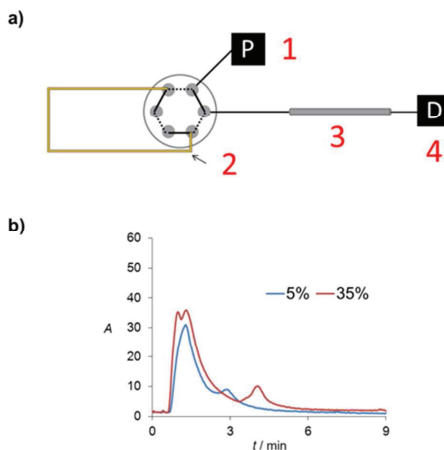


Figure S22. IT-SPME optimization. (a) IT-SPME-Cap-LC manifold: (1) Pump working at isocratic mode, (2) PDMS capillary column coupled to the system injection valve, (3) Jupiter C18 analytical column and (4) DAD detector. (b) Chromatograms obtained using different adsorbent phases with a 35 cm long capillary column.

The chromatogram for 60 μ L of water in IT-SPME with a 70 cm long PDMS-TRB 35 capillary is shown in Figure S23. The later peak of the chromatogram corresponds to an interfering compound (its DAD spectrum is shown in the figure).

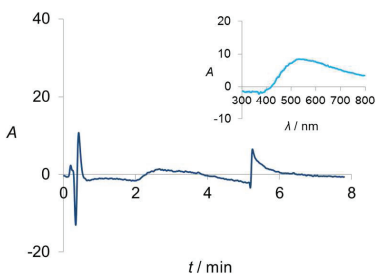


Figure S23. Chromatogram of the blank (loop filled with water) and DAD spectrum of the later peak (up-right) using a 70 cm long PDMS 35 capillary.

IT-SPME-Cap-LC calibration. The IT-SPME-Cap-LC chromatograms of the different levels of concentration as well as the calibration curve are displayed in Figures S24 and S25. The sum of the two peaks obtained was used as analytical signal. The 17.32 nm AgNP synthesis was selected as standard.

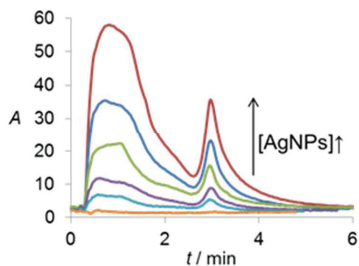


Figure S24. IT-SPME-Cap-LC calibration results. Chromatograms obtained for a blank and five 17.32 nm AgNP levels of concentration within 0-0.33 nM (increasing as the arrow shows).

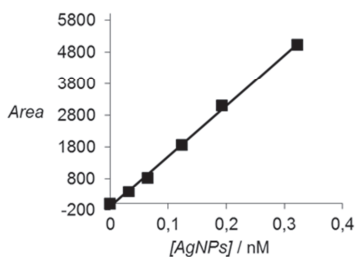


Figure S25. Calibration curve representation for the IT-SPME-Cap-LC method using the 17.32 nm synthesis as standard.

IT-SPME-Cap-LC AuNP mixture. The IT-SPME-Cap-LC chromatograms of an experiment to analyze a mixture of 5 and 20 nm AuNPs are displayed in Figure S26. The calculated ratio for 10 μ L injections were 0.42, 0.13 and 0.79 for the mixture, 5 and 20 nm respectively. The peak ratio of the mixture was an intermediate value suggesting that NPs interact between them. Particle redistribution and water polarization occurred.

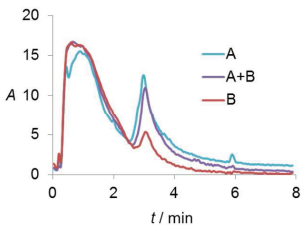


Figure S26. Obtained chromatograms at 530 nm for standard A (1:8 20 nm AuNPs), standard B (1:16 5 nm AuNPs) and mixture A+B (1:8 20 nm AuNPs and 1:16 5 nm AuNPs).

Section 10. Syntheses prepared for DLS measurements

Figure S27 shows both TEM histogram and IT-SPME-Cap-LC chromatogram for the two samples (1 and 2) measured by DLS.

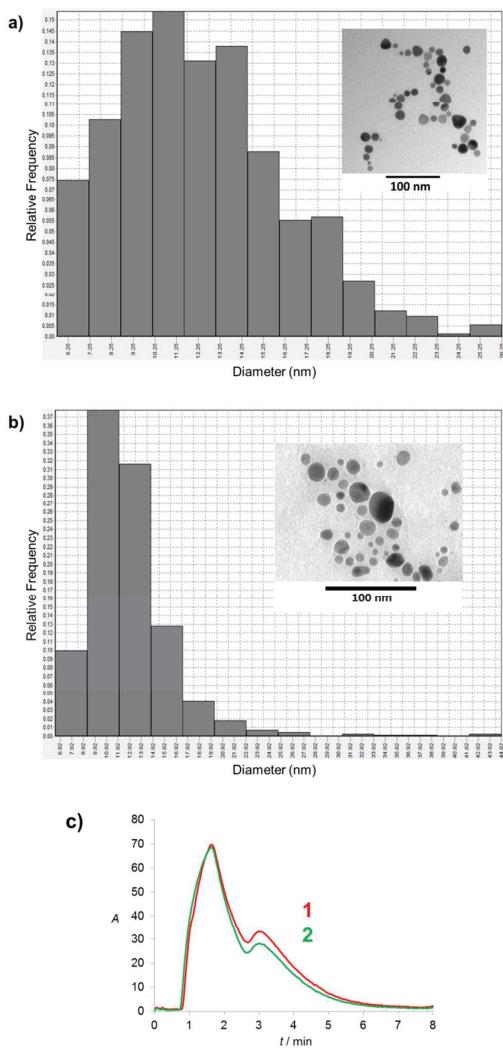


Figure S27. (a) TEM histogram of 12.34 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture. (b) TEM histogram of 12.83 nm AgNPs showing their size distribution. Up-right: TEM picture. (c) IT-SPME-Cap-LC chromatograms for: (1) 1:16 12.34 nm and (2) 1:16 12.83 nm AgNPs.

Section 11. Concentrations (measured and corrected) of the AgNPs samples

Table S1 shows the interpolated concentrations of AgNPs calculated from the peak areas of the chromatograms and the corrected (or final) concentrations of AgNPs after applying the dilution factor. Although in Table S1 only one dilution per sample can be seen, other dilutions were injected and treated as well.

Table S1. AgNPs syntheses parameters

TEM measured Diameter (nm)	Cap-LC interpolated [AgNPs] (nM)	Sample dilution	Cap-LC [AgNPs] (nM)
12.23	0.57	1:16	9.12
12.34*	0.25	1:32	7.98
12.83*	0.23	1:32	7.38
13.92	0.39	1:16	6.24
15.36	0.56	1:8	4.48
16.19	0.30	1:16	4.80
17.32	0.43	1:8	3.45
25.57	0.14	1:8	1.14
38.15	0.22	1:2	0.44

*IT-SPME

References

- [1] González-Fuenzalida, R. A.; Moliner-Martínez, Y.; González-Béjar, M.; Molins-Legua, C.; Verdú-Andrés, J.; Pérez-Prieto, J.; Campins-Falcó, P. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10013-10016.
- [2] Frank, A. J.; Cathcart, N.; Maly, K. E.; Kitaev, V. *Journal of Chem.* **2010**, *87*, 1098-1101.
- [3] Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. *Small* **2009**, *5*, 646-664.
- [4] Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. *RSC Adv.* **2014**, *86*, 3974.
- [5] Lee, P. C.; Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391.
- [6] Pacioni, N. L.; González-Béjar, M.; Alarcón, E.; McGilvray, K. L.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6298.
- [7] Soto-Alvaredo, J.; Montes-Bayón, M.; Bettmer, J. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1316-1321.
- [8] Tang, B.; Xu, S.; Hou, X.; Li, J.; Sun, L.; Xu, W.; Wang, X. *ASC Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 646-653.
- [9] Agnihotri S.; Mukherji S.; Mukherji, S. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 3974-3983.
- [10] Tang, B.; Xu, S.; Hou, X.; Li, J.; Sun, L.; Xu, W.; Wang, X. *ASC Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, *5*, 646-653.
- [11] Zheng, L. Q.; Yu, X. D.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Talanta*, **2014**, *118*, 90-95.

Anexo 7.

Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography.

González-Fuenzalida, R. A., López-García, E., Moliner-Martínez, Y., Campíns-Falcó, P.



Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography



R.A. González-Fuenzalida, E. López-García, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó*

MINTOTA Research Group, Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, c/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2015
Received in revised form 2 January 2016
Accepted 4 January 2016
Available online 7 January 2016

Keywords:

Nanomaterials
Diclofenac
In-tube solid phase microextraction
Liquid nanochromatography

ABSTRACT

Following the present trends in miniaturization, a methodology that combines on-line In-Tube Solid-Phase Microextraction (IT-SPME) with Liquid Nanochromatography (nano-LC) and UV–vis diode array detection (DAD) was developed. This coupling was achieved by using two interconnected valves (i.e. conventional and micro-automatic valves) in the system of injection. As for IT-SPME, different materials, containing in some cases nanostructures or nanoparticles and in other cases polymeric adsorbent phases immobilized on capillary columns, were tested in order to improve extraction efficiencies of organic compounds; diclofenac was selected as the target analyte. Additionally, the transfer time of the sample between the two injection valves, as well as the lengths and the internal diameters of the capillary columns, was optimized. Under the selected conditions, the resulting IT-SPME-nano-LC-DAD method showed great potential to become a powerful analytical tool as it was successfully applied to the determination of diclofenac in pharmaceutical and water samples. For comparison purposes, IT-SPME coupled to Capillary Liquid Chromatography (Cap-LC) was used. The extraction yield of diclofenac reached near 80%, a high value for techniques that involve IT-SPME. Good accuracy (recoveries near 100%) and precision (4% RSD) were obtained.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanomaterials (structures in which at least one dimension is in the nanometer scale, i.e. 1–100 nm), materials based on nanoparticles (NPs) and polymeric adsorbent phases can play a key role in pretreatment and/or clean-up steps since they can improve the extraction efficiency of compounds of interest owing to their high surface area. Thus, the development of new materials for this purpose is a major trend in analytical chemistry [1], as well as in on-line procedures and system miniaturization, for solving economic and environmental issues, improving sensitivity and reducing time of analysis, reagents consumption and sample handling [2].

Among the above mentioned nanomaterials, carbon nanotubes (CNTs) possess interesting characteristics. CNTs are good adsorbents of volatile and semi-volatile organic compounds due to hydrogen bonding, π -stacking and hydrophobic interactions which can be established between them. Adsorption occurs in the easily accessible walls and the interstitial sites of the CNTs. Therefore CNTs can find use as adsorbent phases in extraction techniques such as solid-phase microextraction (SPME) with promising perspectives

[3,4]. Two groups of CNTs can be distinguished: single-walled (SWCNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) consisting of one or more sealed tube-shaped graphene layers respectively. For MWCNTs, the concentric layers are bonded by Van der Waals interactions.

On the other hand, our research group (MINTOTA, Miniaturization and Total Methods of Analysis) together with the Research Team of Molecular Material (RTMM) have developed a nanomaterial based on silica-supported spherical Fe_3O_4 nanoparticles (MNPs) and micelles of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) capable of extracting organic molecules [5] such as emerging pollutants (drugs) in environmental samples [6–8]. In addition to allowing for the determination of organic compounds [9,10], magnetic nanoadsorbents have been used in solid-phase extraction (SPE) for inorganic pollutants analysis [11,12]. Other materials including polymers, macromolecules that are multiples of simpler chemical units, have been used as adsorbents for enhancing the extraction of different compounds. Among them, polypyrrole (PPY) [13] and molecularly imprinted polymers (MIPs) [14] have been successfully applied.

Currently, the main challenge is to achieve the coupling of an analytical system by properly combining extraction, separation and detection steps [15]. All the previously cited materials could be used as coating of a capillary column for on-line extraction proce-

* Corresponding author. Fax: + 34 963543447.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

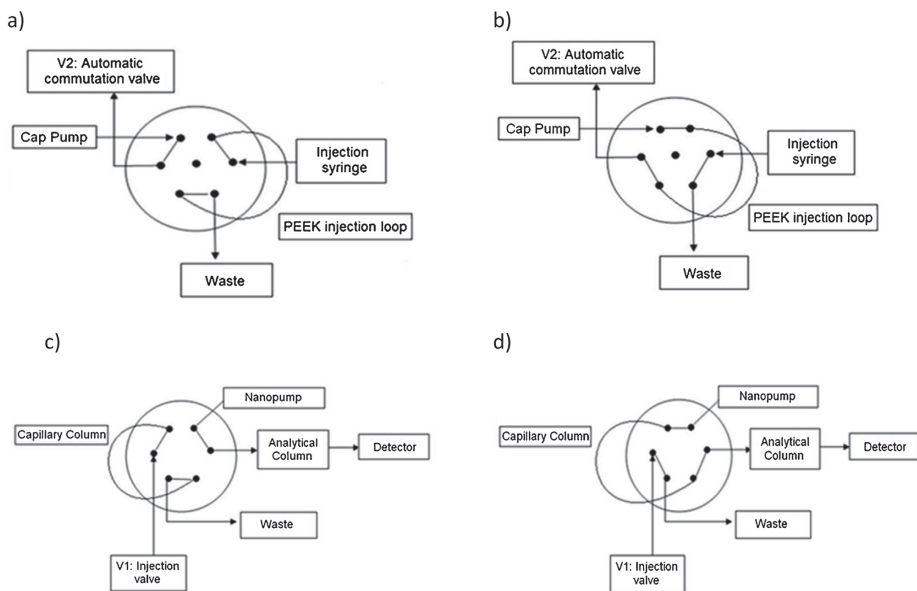


Fig. 1. Nano-LC injection system. (a) Valve 1 at load position. (b) Valve 1 at inject position. (c) Valve 2 at load position. d) Valve 2 at inject position.

dures. Particularly, in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME), the on-line version of SPME, is perfectly suitable for this purpose considering that, in this methodology, a capillary column coated with a polymeric adsorbent phase is coupled to the injection valve of a separation/detection system, usually high performance liquid chromatography (HPLC) [16] or capillary liquid chromatography (Cap-LC) with UV-vis [7] as well as MS detection [6], or directly connected to a detector device (e.g. IT-SPME-DART-MS [17]). Therefore, CNTs and MNPs must be supported on a silica (SiO_2 -PEG) or polymeric matrix such as commercial polydimethylsiloxane (PDMS) with 5 and 35% of polydiphenylsiloxane (PDMS TRB-5 and PDMS TRB-35 respectively). Nevertheless, unmodified commercial PDMS capillary columns have been used for developing IT-SPME-Cap-LC methods to analyze multiresidue organic pollutants [18]. In addition, monolithic capillary columns have been assayed [19,20].

MNPs developed by our group have been tested, exploiting their magnetic properties for off-line (such as magnetic solid phase extraction, MSPE [21]) and on-line extraction procedures [9]. The new phase also allows for the application of, if necessary, an external magnetic field in capillary liquid chromatography (Magnetic IT-SPME-Cap-LC), resulting in an increased extraction efficiency for diverse compounds such as pesticides [9,21] and drugs [8]. Hence IT-SPME offers many possibilities in the field of organic pollutants analysis [18]. Moreover, the variable nature of the capillary coating enables the determination of a wide range of analytes differing in their physicochemical properties.

In the present work, following the miniaturization trend, liquid nanochromatography (nano-LC) has been used as a separation/detection system coupled to on-line IT-SPME as the extraction procedure employing several extractive phases containing nano-materials for determining diclofenac [22]. This organic compound was chosen as target analyte for this study as it is considered an emerging pollutant and is widely used as non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). Nano-LC works with capillary columns

with an internal diameter (i.d.) ≤ 0.100 mm, provides high sensitivity, and consumes minimum solvent and sample volumes (reducing matrix effect) as well as achieving a highly efficient separation [23]. The IT-SPME-nano-LC coupling has been accomplished by combining two interconnected valves (each one with its own pump) in the injection system. The first valve was used for injection and the second one (to which the capillary column was coupled) was responsible for introducing the sample into the nano-LC system automatically. Sample transfer time between the two valves had to be optimized as well as other parameters such as the internal diameter, the length and the coating nature (the adsorbent phase material) of the capillary column. When the best conditions were established, pharmaceutical and environmental samples were analyzed. For comparison purposes, IT-SPME-Cap-LC was used. Promising results were obtained in terms of figures of merit and analyte extraction efficiency making possible the miniaturization of the present analytical tool, while being more environmentally friendly by reducing reagent and solvent consumption. In this work, a configuration for coupling on-line IT-SPME and nano-LC is proposed.

2. Experimental

2.1. Chemicals and instruments

Information on the reagents as well as details of the instrumentation and the chromatographic conditions can be found in the supporting information (SI).

2.2. Nano-LC injection system

Sample injection was carried out using the system (shown in Fig. 1) consisting of a LC isocratic capillary pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) connected to an injection valve (Rheodyne, 7725

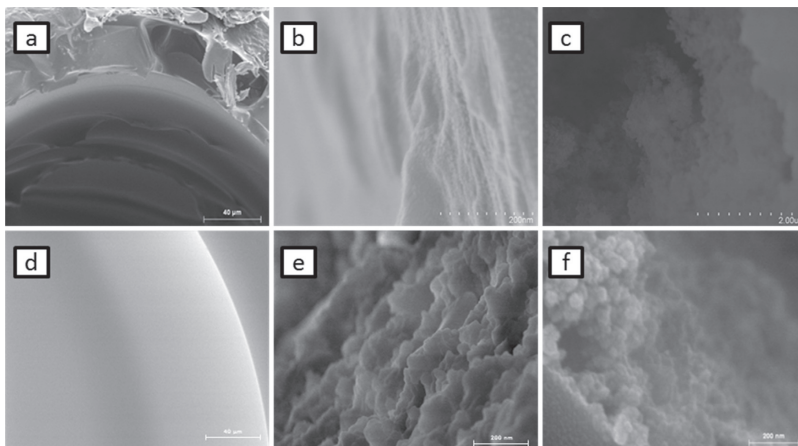


Fig. 2. SEM pictures for capillary characterization (cross-sectional view). (a) Commercial PDMS TRB-5 capillary (40 μm). (b) Capillary based on PDMS TRB-5 supported c-SWNTs (200 nm). (c) Capillary based on PDMS TRB-5 supported c-MWNTs (2 μm). (d) Commercial fused silica capillary (40 μm). (e) Capillary based on SiO_2/PEG supported spherical Fe_3O_4 NPs (200 nm). (f) Capillary based on SiO_2/PEG supported rod-shaped Fe_3O_4 NPs (200 nm). See Table 1 for more information.

model) provided with a PEEK injection loop (0.127 mm i.d. and variable length). This valve (valve 1) was connected to an automatic commutation valve (valve 2) by means of a tubular connection that ended in the capillary column coupled to valve 2, achieving the IT-SPME-nano-LC coupling. In turn, valve 2 was connected to the nanopump.

The PEEK injection loop was filled with the standard or sample using a 500 μL precision syringe when valve 1 was at “load position” (Fig. 1a). Then, when valve 1 was switched to “inject position” (Fig. 1b), the solution was transferred from the injection loop to the capillary column (which worked as a load loop) propelled by the capillary pump at a certain transfer time (a parameter which needed to be optimized). After this time, the capillary pump was switched off. Later, valve 2 which had been at “load position” during the entire process (Fig. 1c) was switched to “inject position” (Fig. 1d) transferring the solution from the capillary column to the analytical column.

As for IT-SPME-Cap-LC, the injection was done in the conventional manner. The capillary (coupled to the injection valve) was filled with the standard or sample solution using a 500 μL syringe and the valve of the system was switched from “load position” to “inject position”.

For both IT-SPME-nano-LC and IT-SPME-Cap-LC, all experiments were performed in duplicate ($n = 2$).

2.3. IT-SPME procedure

Discussion of the IT-SPME procedure is given in the SI for both nano and Cap-LC.

2.4. Preparation of the capillary columns

The different capillary columns were prepared following and/or adapting several methods described in the literature [24–29]. The experimental details are shown in the SI. Table 1 shows all the capillary columns used in the present work.

As for the finally selected capillary column based on SiO_2/PEG supported Fe_3O_4 NPs, the synthesis preparation [27] consisted of: a solution of PEG (0.9 g) and urea (0.9 g) prepared in 10 mM acetic

Table 1

Characteristics of the different capillary columns tested in IT-SPME-nano-LC.

Capillary	Adsorbent phase	Length (mm)	i.d. (mm)	V_{int}^a (μL)
Capillary 1	PDMS TRB-5	170	0.1	1.34
Capillary 2	PDMS TRB-5 c-SWNTs	170	0.1	1.34
Capillary 3	PDMS TRB-5 c-MWNTs	130	0.1	1.02
Capillary 4	PDMS TRB-5 c-SWNTs	170	0.1	1.34
Capillary 5	SiO_2/PEG spherical Fe_3O_4	190	0.1	1.49
Capillary 6	SiO_2/PEG spherical Fe_3O_4	130	0.1	1.02
Capillary 7	SiO_2/PEG spherical Fe_3O_4	120	0.1	0.94
Capillary 8	SiO_2/PEG c-SWNTs	122	0.1	0.96
Capillary 9	SiO_2/PEG spherical Fe_3O_4	131	0.075	0.58
Capillary 10	SiO_2/PEG spherical Fe_3O_4	150	0.075	0.66
Capillary 11	SiO_2/PEG rod-shaped Fe_3O_4	150	0.075	0.66
Capillary 12	SiO_2/PEG	250	0.075	1.1
Capillary 13	PDMS- Fe_3O_4 gel	350	0.075	1.55
Capillary 14 ^b	SiO_2/PEG spherical Fe_3O_4	310	0.1	2.43

^a Internal volume.

^b Capillary tested only in IT-SPME-Cap-LC.

acid (10 mL). The next step was to mix 2.5 mL of this solution with 1 mL of the previously synthesized Fe_3O_4 -CTAB water dispersion (spherical or rod-shaped NPs). Then, the pH was adjusted to 11 with 1 M NaOH (7 mL) and TEOS was added for forming the SiO_2 -PEG matrix in which the Fe_3O_4 -CTAB micelles are embedded. This mixture was stirred until it became a homogenous gel, which was injected into the fused silica capillary column (0.075 or 0.100 mm i.d. and variable length) previously treated with 1 M NaOH. Later, after sealing its ends, the capillary was placed into the oven for 20 h at 43 $^\circ\text{C}$. Then, the temperature was raised to 120 $^\circ\text{C}$ at 0.5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ and kept constant for 2 h, followed by washes with water and methanol. Finally, after drying, the capillary was heated at 330 $^\circ\text{C}$ for 25 h. In addition, the same procedure was repeated without adding Fe_3O_4 NPs obtaining SiO_2 -PEG capillary columns.

2.5. Samples

Tablets of Voltaren (Novartis) containing 50 mg of diclofenac sodium were purchased from a local pharmacy. Water samples

from different Valencian Community rivers were collected in dark glass containers and stored at 4 °C until analysis.

3. Results and discussion

3.1. Capillary column characterization by SEM

SEM pictures taken for the tested capillaries are displayed in Fig. 2. SEM pictures of capillaries based on commercial PDMS TRB-5, PDMS TRB-5 supported c-SWNTs and PDMS TRB-5 supported c-MWNTs are displayed in Fig. 2a–c respectively. Commercial PDMS TRB-5 presented numerous surface folds due to diphenyl group functionalization and a good adsorption of the analytes could be foreseen. Even this adsorption could be increased considering that CNTs (c-SWNTs and c-MWNTs) enhanced the material porosity and thus, the surface contact area.

For the capillaries based on SiO₂/PEG-supported spherical Fe₃O₄ NPs and SiO₂/PEG-supported rod-shaped Fe₃O₄ NPs, in which both adsorbents were immobilized in a fused silica capillary, the same procedure was followed and similar results were obtained. SEM pictures for capillaries with spherical and rod-shaped NPs are shown in Fig. 2e and f respectively. Coating thickness was estimated to be 10 μm for these capillaries. On the other hand, Fig. 2d shows a commercial and unfunctionalized fused silica capillary. If the obtained images are compared, the presence of the adsorbent provided a highly porous net where analytes could be retained more efficiently due to the interactions with the alkyl chains of the CTAB micelles [6].

3.2. Optimization of the nano-LC conditions

The nano-LC system was composed of a PEEK injection loop of variable length (thus, variable internal volume) connected to the first valve and one of several capillary columns (see Table 1) connected to the second valve (see Fig. 1). The mobile phases used consisted of 10:90 (v/v) acetonitrile/water for the capillary pump which fills the loop of valve 2 from valve 1 where the sample is loaded (as can be seen in Fig. 1) and 50:50 (v/v) for the nanopump which carries out the separation. The flow rates for the capillary pump and the nanopump were fixed at 50 and 0.2 μL min⁻¹ respectively. Depending on the operational circumstances for a given capillary, the nanopump flow rate was decreased (to avoid system overpressure) or increased (to reduce analysis time if the working pressure allowed it). For this matter, injections of a 1 μg mL⁻¹ diclofenac standard were performed, completely filling the first injection loop. A PEEK injection loop of 8 μL was selected. Diclofenac standards were prepared in acidified water (pH of 3.8) considering the diclofenac pK_a value (4.0). Working under these conditions a higher proportion of diclofenac in its neutral form is assured, thus retention in the non-polar capillary column is increased.

The main challenge of the coupling of the proposed system is to combine capillary and nano dimensions. LC systems with 2 valves, 2 pumps and 1 capillary column (besides the separation column) are described in the literature [19,30–34]. However, most of them deal with Cap-LC using monolithic columns for the IT-SPME [19,30–33] and not IT-SPME-nano-LC. Also, an automatic valve has been used before [33] as in the proposed method. There is one study in nano-LC (with MS detection) [34] which used a similar 2-valve system configuration, but samples were directly injected into a monolithic trapping column (coupled to one valve). The mobile phase passed through the other valve coupled in turn to a loop containing a tuning solution (necessary for MS standardization), then through the trapping column and finally, the rest of the system. In other words, there was not sample transference from one valve to the other as in

the present work. Here, by adapting elements from other methods, a new system configuration is presented.

The remaining question is how to achieve a successful coupling from the different parts of the system. The two-step injection (explained in Section 2.2), the system automaticity (in valve 2) and the controlled transfer time between valves are crucial factors in accomplishing this task.

3.3. Transfer time

As it has been previously explained, the time it takes for the mobile phase, propelled by the capillary pump, to carry the standard or sample from the PEEK injection loop to the capillary column is defined as the transfer time, a parameter that must be optimized for each capillary column tested which can differ in nature, length and internal diameter. Experimentally, this parameter was measured as the time counted from the moment at which the capillary pump was switched from on to off. Injections of a diclofenac standard of 400 ng mL⁻¹ (300 ng mL⁻¹ for capillaries with 0.075 i.d.) were performed in order to obtain the more intense signal at a given transfer time.

All the capillary columns described in Table 1 were tested. Results are shown and described in the SI. In summary, the optimum transfer times were 15 s for capillaries 1, 3, 6, 7 and 8; 20 s for capillaries 4, 5, 9, 10 and 11; 25 s for capillaries 2 and 12.

3.4. Dimensions of the capillary columns: length and internal diameter

These two parameters can be evaluated in terms of intensity of the analytical signal (peak area), peak profile and retention time for diclofenac. Injections of a diclofenac standard of 400 ng mL⁻¹ were performed at the optimum transfer time depending on the capillary column used.

For studying the effect of the capillary length, comparisons between capillaries 2 (170 mm) and 3 (130 mm) for capillary columns based on PDMS and between capillaries 5 (190 mm), 6 (130 mm) and 7 (120 mm) for those based on silica were made. Results (obtained chromatograms) are displayed in Fig. 3a. When PDMS capillaries were compared, similar peak areas and peak profiles were obtained for the two of them, but retention time decreased from 26 to 21 min when the shorter capillary column (capillary 3) was used (the flow rate was 0.1 μL min⁻¹ for both capillaries). As for capillaries 5 and 6, a flow rate of 0.3 μL min⁻¹ was used and 0.2 μL min⁻¹ for capillary 7. The lowest and highest retention times were obtained for capillaries 6 (7.7 min) and 7 (11 min) respectively. For capillary 5 (retention time of 10 min), a larger peak area was obtained, but the peak profile was not as good as the other two capillaries in terms of peak width and height. The best peak profile was achieved for capillary 7 (120 mm) and considering that the peak area was higher than the one obtained for capillary 6, it presented the best overall result (despite exhibiting a longer retention time).

Therefore, better results were achieved when the length of the capillary column was reduced for both PDMS and silica based capillaries. Whether to use adsorbent phases based on PDMS or silica is a matter which will be discussed later on.

On the other hand, the effect of the internal diameter was evaluated by comparing two capillaries with the same length such as capillaries 6 (0.1 mm i.d.) and 9 (0.075 mm). When this parameter is reduced, the internal volume of the capillary column is decreased as well. However, considering that the thickness of the adsorbent phase (approximately 10 μm) represents a small fraction of the unmodified internal diameter, the adsorbent density is increased as well as the contact with analytes. Nevertheless, experimentally, working with a 0.075 mm i.d. capillary resulted in reducing flow

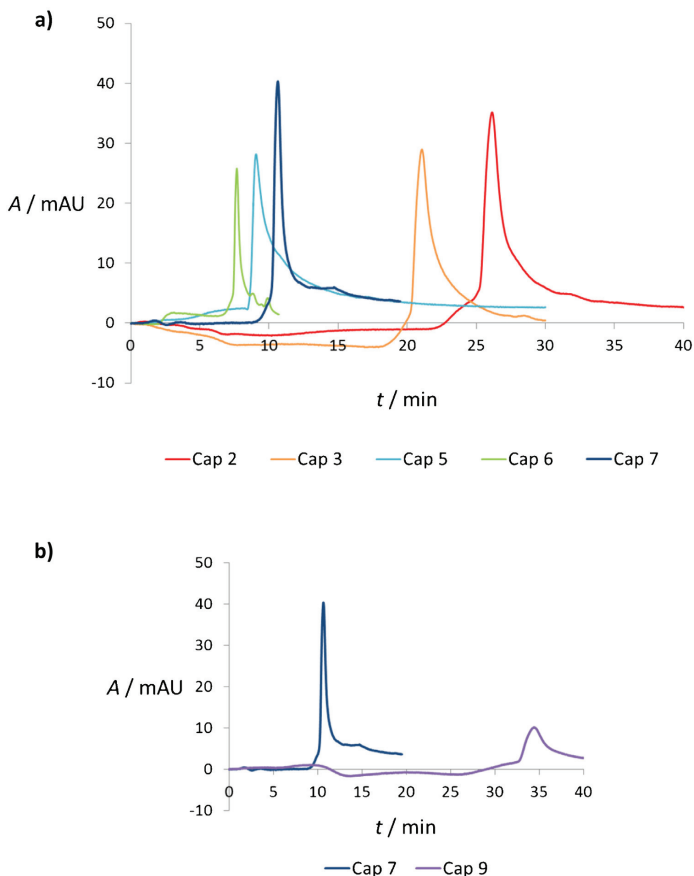


Fig. 3. Chromatograms of a diclofenac standard of 400 ng mL^{-1} for the optimization of the capillary column dimensions. (a) Capillary length optimization for PDMS (capillaries 2 and 3) and silica (capillaries 5–7) based capillary columns. (b) Internal diameter optimization for silica-based capillary columns.

rates and the system was not able to handle flow rates superior to $0.1 \mu\text{L min}^{-1}$ which might cause an overpressure. The use of capillary 6 improved both peak profile and area as well as the retention time compared to capillary 9. The chromatograms are shown in Fig. 3b. Hence, due to experimental issues and longer analysis time for capillaries with smaller internal diameter (the retention time for diclofenac was 35 min when the capillary 9 was used working at $0.05 \mu\text{L min}^{-1}$), capillary columns with higher internal diameter were selected as they provided the best results.

3.5. IT-SPME-Nano-LC calibration

Although some capillaries showed better characteristics in the analysis of diclofenac than others, calibration curves were obtained for all the capillary columns in order to evaluate linearity and sensitivity by means of the coefficient of determination (R^2) and the curve slope respectively. Table 2 shows the analytical parameters of

Table 2

Analytical parameters obtained for each capillary column tested during IT-SPME-nano-LC calibration.

Capillary	$y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) \times x$		R^2
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	
Capillary 1	-145 ± 77	0.72 ± 0.06	0.9941
Capillary 2	-20 ± 33	4.5 ± 0.2	0.9961
Capillary 3	-47 ± 40	4.8 ± 0.2	0.9978
Capillary 4	3 ± 34	3.0 ± 0.2	0.9949
Capillary 5	310 ± 124	2.5 ± 0.4	0.9324
Capillary 6	-7 ± 14	1.77 ± 0.05	0.964
Capillary 7	80 ± 48	2.7 ± 0.2	0.9902
Capillary 8	80 ± 48	0.42 ± 0.2	0.9813
Capillary 9	-27 ± 47	2.0 ± 0.2	0.9822
Capillary 10	-46 ± 9	2.34 ± 0.05	0.9995
Capillary 11	360 ± 60	1.4 ± 0.3	0.9446
Capillary 12	50 ± 20	1.9 ± 0.1	0.9958

the calibration process in a working range from 0–400 ng mL⁻¹ for all the studied capillaries. Further information about the capillaries is displayed in Table S1 of the SI.

When the capillary columns based on PDMS TRB-5 (capillaries 1–4) were compared, the analytical parameters demonstrated that the presence of CNTs improved the extraction efficiency and the sensitivity for diclofenac compared to the unfunctionalized PDMS TRB-5 capillary. For this last parameter, the use of a capillary modified with c-SWNTs (capillaries 2 and 3) performed better than the one modified with c-MWNTs. For this group, linearity was excellent. Finally, the 130 mm long PDMS TRB-5 supported c-SWNTs capillary (capillary 3) was the best choice ($R^2 = 0.9978$ and slope = 4.8 mL ng⁻¹) among the other PDMS capillary columns. The worst result was obtained for the unmodified PDMS TR-5 capillary. The profile of the chromatographic peak could explain the high ordinate and the low slope values (see Table 1).

For the capillary columns based on SiO₂/PEG supported spherical Fe₃O₄ NPs with 0.1 mm i.d. (capillaries from 5–7), the use of the 120 mm long capillary (capillary 7) achieved the best linearity ($R^2 = 0.9902$) and sensitivity (slope = 2.7 mL ng⁻¹). Additionally, a capillary column based on SiO₂/PEG supported c-SWNTs (capillary 8) was tested, but the results were not satisfactory (the lowest slope obtained as Table 2 shows). Capillary 5 provided a high ordinate value probably due to a poor calibration fit.

For capillary columns based on SiO₂/PEG supported Fe₃O₄ NPs with 0.075 mm i.d. (capillaries from 9–12), the use of the 150 mm long capillary (capillary 10) achieved the best linearity ($R^2 = 0.9995$) and sensitivity (slope = 2.34 mL ng⁻¹). This fact can be explained as, at this length, the flow rate could be higher without increasing too much the system pressure (as in the case of capillary 9) and better peak profiles were obtained. Capillary 11 was prepared using rod-shaped Fe₃O₄ NPs with the same dimensions as capillary 10 (length, i.d. and internal volume). It is important to note that the rod-shaped Fe₃O₄ NPs were evaluated as a novelty since spherical Fe₃O₄ NPs are typically used in the synthesis of MINTOTA-RTMM adsorbent nanomaterial [6]. From this result, it can be stated that, if NP forms were changed from spheres to rods, analytical results were not as good as the ones obtained when the nanoparticles were spherical (slope = 1.4 mL ng⁻¹ and $R^2 = 0.9446$, both values lower than those obtained for capillary 10, obtaining a higher ordinate value probably due to a poor calibration fit, Table 1).

3.6. Extraction efficiency

This parameter, described as the main drawback of IT-SPME due to its low value, is an important factor which has not been discussed yet. Increasing this parameter by means of using new adsorbent phases and innovative system configurations (as described in the literature) [7, 19, 30–34] is one of the main challenges of the present work. The extraction efficiency (expressed as a percentage) was evaluated as the ratio of signals for a given amount of analyte obtained for the proposed method and one without active phase that employs the IT-SPME-nano-LC procedure in which the capillary column was changed to a 150 mm long PEEK loop (0.050 mm i.d. and internal volume of 0.29 μ L). In both methods, the 8 μ L PEEK injection loop was used. Results are shown in Fig. 4. In a previous work [7] in which IT-SPME-Cap-LC and NP-based capillaries were used, the extraction efficiency obtained for diclofenac was 39%. By using nanochromatography, this parameter improved in most cases (as for capillaries 2, 3, 7, 9–11) and was comparable in others (capillaries 4 and 5). Capillary 6 was the only exception to the rule (27%). In this case, non-optimal operative conditions could explain this result. Capillaries based on SiO₂/PEG supported Fe₃O₄ and PDMS TRB-5 supported c-SWNTs reached values of 62 and 74% respectively. Also, for the capillary column based on SiO₂/PEG (capillary 12) which was used to evaluate the effect of micellar Fe₃O₄ NP

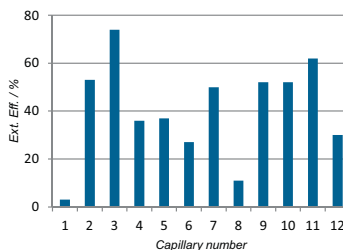


Fig. 4. Extraction efficiencies (Ext. Eff.) for the 12 capillary columns tested in IT-SPME-nano-LC.

presence, an extraction efficiency of 30% was obtained, confirming that Fe₃O₄ NPs increased the extraction efficiency of diclofenac. On the other hand, for capillary 1, the low extraction efficiency (3%) is in agreement with the values obtained for other organic compounds using these commercial polymeric capillaries (e.g. for triazines, <11%) [8]. As for capillary 8, the poor efficiency (11%) could be explained by a low nanomaterial (silica-CNTs) bonding in the capillary synthesis (the only tested capillary based on silica supported CNTs).

The fact that IT-SPME-nano-LC enhances the extraction efficiency of diclofenac in comparison to IT-SPME coupled to HPLC or Cap-LC using existing sorbent phases (values typically between 10 and 30%) [7] is mainly due to the particular hydrodynamic conditions provided by the nano-LC system configuration. The use of nanoflow rates and low solvent volumes minimizes both the dilution of the sample injected in the system and the hydrodynamic motion through the capillary, allowing for a better analyte adsorption. In addition, it was verified that all the synthesized nanomaterials have higher adsorptive capacity than the commercial polymeric phases.

3.7. Capillary column selection

The next step was to select the best capillary column for further studies. Capillary 7 was selected because, although not providing the best extraction efficiency for diclofenac compared to other capillaries (a value of 50%, see Fig. 4), it considerably reduced analysis time (retention time of 11 min for diclofenac) by allowing the use of higher flow rates without generating system overpressures. Additionally, the resulting peak profiles were better: well defined, narrower and higher peaks were obtained (Fig. 3a). As for the IT-SPME-nano-LC using capillary 7, the detection and quantification limits (LOD and LOQ) were calculated as the concentration that provided a signal-to-noise ratio of 3 and 10 respectively. The values were 1.0 ng mL⁻¹ for LOD and 3.3 ng mL⁻¹ for LOQ. Precision was evaluated intraday ($n = 5$) as the relative standard deviation (RSD) obtaining 4%. Also, carryover studies were made by processing successive blanks after diclofenac standards were injected for checking sample cross-contamination absence (reproducibility was not affected either). Diclofenac was not detected in any blank. On the other hand, the number of times that this capillary could be used without losing adsorption capacity (or nanomaterial leaching being negligible) was estimated to be more than 100 (in all the experiments, the capillary column was never changed). Thus, a new method for analyzing diclofenac has been developed.

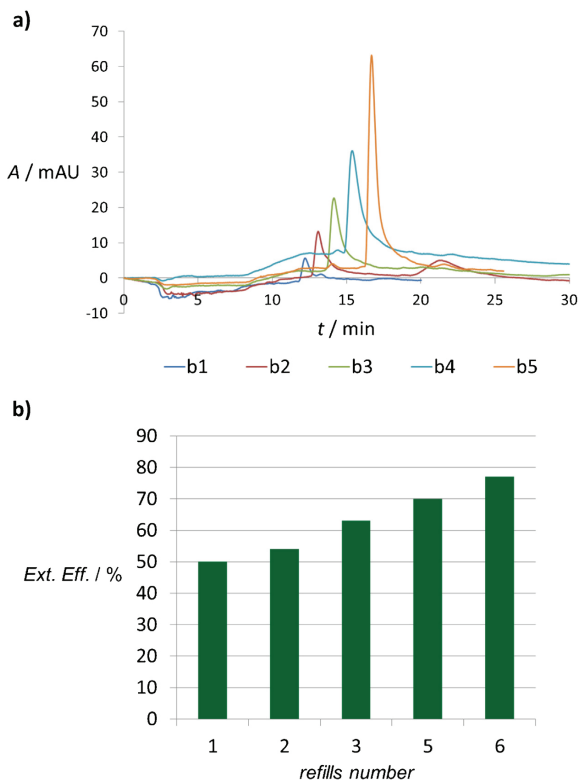


Fig. 5. Preconcentration studies. (a) IT-SPME-nano-LC chromatograms using capillary 7 as capillary column for a diclofenac standard of 100 ng mL^{-1} varying the number of times the PEEK injection loop of valve 1 was refilled in each chromatographic run: 1 (b1), 2 (b2), 3 (b3), 5 (b4) and 6 (b5) times. (b) Plot of extraction efficiency (Ext. Eff.) vs the number of refills for capillary 7.

3.8. Analysis of voltaren and water samples from rivers of the Valencian community

As a method application, Voltaren (containing 50 mg of diclofenac) and water samples were analyzed. Diclofenac is widely used as a medicament and it has been placed by the European Parliament and Council in the priority watch list of emerging contaminants in the context of water policy due to its high production and potential risks [35]. All the samples were directly loaded into the capillary column without previous treatment steps. Spiked samples were analyzed and recoveries between $100 \pm 10\%$ were obtained for the two matrices assayed. No matrix effect was detected.

Voltaren analysis tested the method accuracy to determine diclofenac. For preparing the sample, a drug tablet was triturated and conveniently diluted in water (acidified to 3.8 with 1 M hydrochloric acid, HCl) considering the method working range ($0\text{--}400 \text{ ng mL}^{-1}$). Using capillary 7 and its previously determined transfer time of 15 s, the retention time of diclofenac was 10.5 min (chromatograms ($n = 2$) of the sample are shown in the SI). The estimated concentration of diclofenac using the previously established

calibration curve for capillary 7 (Table 2) was $55 \pm 3 \text{ mg per tablet}$ (4% RSD). For the water analysis, samples from different Valencian Community rivers were studied. The water samples were only centrifuged before being injected. Diclofenac was not detected in any sample.

3.9. IT-SPME-nano-LC vs IT-SPME-Cap-LC

The optimized method was compared to IT-SPME coupled to capillary liquid chromatography (IT-SPME-Cap-LC). A comparison between different operative values is displayed in Table 3. Analytical calibration was performed and the obtained equation had a slope of $8.8 \pm 0.3 \text{ mL ng}^{-1}$ and a R^2 of 0.9987. Considering that, in IT-SPME-Cap-LC, a volume of $200 \mu\text{L}$ of the diclofenac standard (the optimal volume in which no analyte auto-elution occurred and that provided higher signals [7]) were processed and the internal volume of the capillary column was $2.43 \mu\text{L}$ (against $0.94 \mu\text{L}$ for IT-SPME-nano-LC). Results were comparable (calibration slopes varied quite proportionally as the internal volumes did). The LOD of the IT-SPME-Cap-LC method was experimentally estimated to be 1.0 ng mL^{-1} (by injecting successive dilutions of a diclofenac stan-

Table 3
Comparison between the different parameters of IT-SPME-nano-LC (capillary 7) and IT-SPME-Cap-LC.

Parameter	IT-SPME-nano-LC	IT-SPME-Cap-LC
Processed volume (μL)	Full loop: 0.94 or 6x(0.94)	200
Sample pH	3.8	3.8
Capillary internal volume (μL)	0.94	2.43
Cap pump flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	^a 50	10
Mobile phase (MeCN/ H_2O)	^a 10/90	^b Gradient
Nano pump flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	0.2	–
Mobile Phase (MeCN/ H_2O)	50/50	–

^a For transferring the sample to valve 2 (see Section 2 and SI).

^b See SI.

ard until the signal could not be clearly distinguished from the background noise), the same value obtained for IT-SPME-nano-LC (a similar value was also obtained for the LOQ of IT-SPME-Cap-LC). From a previous work, a LOD of 1.7 ng mL^{-1} was reported. Slight differences could come from the analyte preconcentration process which may occur when higher sample volumes are injected. Therefore, the IT-SPME-nano-LC preconcentration must be studied in order to confirm if the proposed method could still prove to be a reliable tool for trace analysis.

However, there is one difference besides lower volume consumption of solvent and sample volume which proves that IT-SPME-nano-LC provides better results than IT-SPME-Cap-LC: a higher extraction efficiency of diclofenac. For IT-SPME-Cap-LC, a 36% of extraction efficiency (calculated as it was done in previous works [6,7,19]) was obtained and is clearly lower than the value obtained for capillary 7 (Fig. 4). This result confirmed what was previously stated: the new proposed IT-SPME-nano-LC coupling improves the analyte extraction.

3.10. Preconcentration in IT-SPME-nano-LC

For estimating preconcentration, the following study was performed by changing the injection procedure of the standard or sample (for this study, a 100 ng mL^{-1} standard was used): the two valves were set on “load position”. The PEEK injection loop was filled, valve 1 was set to “inject position” and the capillary pump was switched on. After the 15 s of transfer time, the capillary pump was switched off and valve 1 was set again to “load position”. The PEEK injection loop was filled a second time and the complete process repeated (5 additional times). Finally, when the capillary pump was switched off, valve 2 was set to “inject position” and the nanopump which was switched on during the entire procedure propelled the transfer of the standard solution to the analytical column.

This procedure is completely automated and, as Fig. 5a shows, analyte preconcentration occurred effectively. The PEEK injection loop had an internal volume of $8 \mu\text{L}$. This quantity of solution was transferred to capillary 7 which had, in turn, a smaller internal volume of $0.94 \mu\text{L}$. Therefore, the fact that the analytical signal increased proportionally with the number of times the PEEK loop was refilled is a clear sign that the nanomaterial of the capillary column adsorbed the analytes efficiently. If effective retention had not occurred there would be no increase in signal, which means a new solution volume coming from the PEEK loop would only displace the $0.94 \mu\text{L}$ of solution that filled the capillary from the previous transfer. After clarifying this effect, the next step was to evaluate the analyte preconcentration through an estimation of the extraction efficiency in each run. If this parameter increased with the number of refills, it would mean that passing more sample volume promoted the retention of a growing number of diclofenac molecules with each refill procedure. A representation of the extraction efficiency vs the number of refills is displayed in Fig. 5b. The increase of the extraction efficiencies of diclofenac

was almost linear ($R^2 = 0.984$). This result is very important because it proves that with only a manual operation (i.e. multiple refills) the extraction of diclofenac can be improved in the proposed IT-SPME-nano-LC method. With 6 refills, nearly 80% of diclofenac is extracted, a very high value considering that IT-SPME technique is involved.

4. Conclusions

In the present work, adsorbent phases with nanomaterials for IT-SPME have been studied in order to improve the extraction efficiency of the analytes. These adsorbent phases were immobilized on capillary columns which were coupled online to a liquid nanochromatography system. This innovative coupling was achieved by using two interconnected valves (a conventional injection valve and an automatic commutation valve) each one having its own pump in the system of injection. The system configuration succeeds in combining capillary flow injection with nanochromatography despite the difference in i.d. connections.

In addition to good analytical parameters (notably regarding sensitivity, linearity and precision), excellent results were obtained in terms of the extraction efficiency of the analytes (usually considered to be the main issue in IT-SPME) in diclofenac determination. This parameter enhancement is due to the high adsorbent capacity of the IT-SPME sorbent phase based on nanomaterials, the system preconcentration and the particular hydrodynamic conditions provided by the nano-LC system configuration. Among the materials tested for IT-SPME, a capillary column based on SiO_2/PEG supported Fe_3O_4 NPs was selected considering a compromise between efficiency and cost-effectiveness. Refilling the loop 6 times improved the extraction efficiency from 50 to 80%. Also, the effective preconcentration is boosted by the automated and time-controlled transfer of the sample from the injection valve to the capillary column. On the other hand, in IT-SPME-nano-LC, the injected sample is not significantly diluted as low solvent volumes are used and nanoflow rates promote better adsorption of the analytes on the capillary sorbent phase. Additionally, the developed method was successfully applied to diclofenac determination in environmental and pharmaceutical samples.

According to the overall IT-SPME-nano-LC results, the proposed system, as it is shown, has the potential to become a powerful tool for trace analysis of emerging contaminants.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER (project CTQ2011–26760, CTQ2014–53916–P) and Generalitat Valenciana (PROMETEO program 2012/045). R.A. G.-F. expresses his gratitude for a grant *Atracció Talent* to the University of Valencia.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.009>.

References

- [1] K. Pyrzynska, Use of nanomaterials in sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 109–108.
- [2] G. D’Orazio, S. Fanali, Combination of two different stationary phases for on-line pre-concentration and separation of basic drugs by using nano-liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 118–123.
- [3] J. Xu, J. Zheng, J. Tian, F. Zhu, F. Zeng, C. Su, G. Ouyang, New materials in solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 47 (2013) 68–83.

- [4] N. Jornet-Martínez, P. Serra-Mora, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, Evaluation of carbon nanotubes functionalized polydimethylsiloxane based coatings for in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography, *Chromatographia* 2 (2015) 515–528.
- [5] P. Campins-Falcó, Eugenio Coronado Y. Moliner-Martínez Antonio Ribera H. Prima-García, Patent Application P201100823, Spain, 2014.
- [6] Y. Moliner-Martínez, Antonio Ribera, Eugenio Coronado, P. Campins-Falcó, Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe3O4 magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2276–2283.
- [7] Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, Antonio Ribera, Eugenio Coronado, P. Campins-Falcó, Magnetic in-tube solid phase microextraction, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7233–7240.
- [8] R.A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, Antonio Ribera, P. Campins-Falcó, J.R. Zaragoza, Evaluation of superparamagnetic silica nanoparticles for extraction of triazines in magnetic in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography, *Nanomaterials* 4 (2014) 242–255.
- [9] L.S. Ibarra, J.A. Rodríguez, J.M. Miranda, M. Vega, E. Barrado, Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2196–2202.
- [10] F. Bianchi, V. Chiesi, F. Casoli, P. Luches, L. Nasi, M. Careri, A. Mangia, Magnetic solid-phase extraction based on diphenyl functionalization of Fe3O4 magnetic nanoparticles for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples, *J. Chromatogr. A* 1231 (2012) 8–15.
- [11] M. Faraji, Y. Yamini, A. Saleh, M. Rezaee, M. Ghambarian, R. Hassani, A nanoparticle-based solid-phase extraction procedure followed by flow injection inductively coupled plasma-optical emission spectrometry to determine some heavy metal ions in water samples, *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 172–177.
- [12] G. Chen, M. He, H. Peng, B. Hu, Dithizone modified magnetic nanoparticles for fast and selective solid phase extraction of trace elements in environmental and biological samples prior to their determination by ICP-OES, *Talanta* 88 (2012) 507–515.
- [13] J. Wu, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, Analysis of polar pesticides in water and wine samples by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 357–367.
- [14] W.M. Mullet, P. Martín, J. Pawliszyn, In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2383–2389.
- [15] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 205–213, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.020>.
- [16] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140–3147.
- [17] X. Wang, Z. Li, Y. Zhang, Y. Bai, H. Liu, Online coupling of in-tube solid-phase microextraction with direct analysis in real time mass spectrometry for rapid determination of triazine herbicides in water using carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4739–4747.
- [18] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez, In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2695–2702.
- [19] Y. Fan, Y.Q. Feng, S.L. Da, Z.G. Shi, Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 251–258.
- [20] C. Huang, B. Hu, Silica-coated magnetic nanoparticles modified with (-mercaptopyrithrimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd, Cu Hg, and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 63 (2008) 437–444.
- [21] Y. Moliner-Martínez, Y. Vitta, R.A. González-Fuenzalida, Antonio Ribera, P. Campins-Falcó, Eugenio Coronado, Silica supported Fe3O4 magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2211–2215.
- [22] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Determination of pharmaceuticals in water samples of the belgian coastal zone and the scheldt estuary using LC-MS, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159.
- [23] R. Roux, M. Abi Jaoudé, C. Demesmay, J.-L. Rocca, Optimization of the single-step synthesis of hybrid C8 silica monoliths dedicated to nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 120–127.
- [24] S. Sun, H.J. Zeng, Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles, *Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 8204–8205.
- [25] B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 203–207.
- [26] L. Sombra, Y. Moliner-Martínez, M. Valcárcel, Carboxylic multi-walled carbon nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 29 (2008) 3850–3857.
- [27] T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7632–7642.
- [28] B.E. Slentz, N.A. Penner, E. Lugowska, F. Regnier, Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane), *Electrophoresis* 22 (2001) 3736–3743.
- [29] I.S. Park, E. Heo, Y.S. Nam, C.W. Lee, J.M. Kim, Colorimetric detection of aliphatic primary amines and a molecular logic gate based on a photochromic phenoxiquinone derivative, *J. Photochem. Photobiol.* 238 (2012) 1–6.
- [30] F. Wei, Y.Q. Feng, Methods of sample preparation for determination of veterinary residues in food matrices by porous monolith microextraction-based techniques, *Anal. Methods* 3 (2011) 1246–1256.
- [31] L. Xu, Z.G. Shi, Y.Q. Feng, Porous monoliths: sorbents for miniaturized extraction in biological analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3345–3357.
- [32] M.L. Chen, S.S. Wei, B.F. Yua, Y.Q. Feng, Preparation of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography and its application in determination of nucleosides in urine, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 183–192.
- [33] B. Lin, M.M. Zheng, S.C. Ng, Y.Q. Feng, Development of in-tube solid-phase microextraction coupled to pressure-assisted CEC and its application to the analysis of propranolol enantiomers in human urine, *Electrophoresis* 28 (2007) 2771–2780.
- [34] M.L. Chen, X.M. Fu, J.Q. Liu, T.T. Ye, S.Y. Hou, Y.Q. Huang, B.F. Yuan, Y. Wu, Y.Q. Feng, Highly sensitive and quantitative profiling of acidic phytothormones using derivatization approach coupled with nano-LC-ESI-Q-TOF-MS analysis, *J. Chromatogr. B* 905 (2012) 67–74.
- [35] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, 12 August 2013.

Anexo 7.

Supporting Information

for

**Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase
microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography.**

Supporting Information for

Adsorbent phases with nanomaterials for In-Tube Solid-Phase Microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography

R. A. González-Fuenzalida, E. López-García, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó*

*Corresponding author: E-mail: pilar.campins@uv.es, Tlf: (+) 349635443002; Fax:(+)34963543447

Acknowledgements. The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER (projects: CTQ2011-26760, CTQ-2014-53916-P) and Generalitat Valenciana (PROMETEO program 2012/045). R.A. G.-F. expresses his gratitude for a grant to the University of Valencia.

S1. Experimental details	1
S2. Capillaries preparation for IT-SPME	3
S3. IT-SPME procedure	4
S4. Complementary studies	4
S5. Sample analysis	6
S6. References	6

S1. Experimental details

Chemicals

Diclofenac (as diclofenac sodium), iron(III)acetylacetonate ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), 1,2-hexadecanediol, oleylamine, oleic acid, tetraethylorthosilicate (TEOS), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), polyethylene glycol (PEG), glutaraldehyde, phenyl ether, (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTS), 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, single-walled and multi-walled carbon nanotubes (SWCNTs and MWCNTs), SYLGARD® 184 silicon elastomer base and SYLGARD® 184 silicon elastomer currying agent were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol, acetonitrile and acetone (HPLC grade) were obtained from Teknokroma (Barcelona, Spain). Chloroform, dimethylformamide (DMF), hydrochloric (37%), nitric and sulfuric acid were supplied by Scharlau (Barcelona, Spain). Urea was purchased from Prolabo (Fontenay, France). Glacial acetic acid was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Boric Acid was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide was obtained from Mallinckrodt Baker (Deventer, Holland). Water for all

experiments was purified through a Barnstead NANOpure II system and then filtered through 0.45 μm nylon membranes from Teknokroma (Barcelona, Spain). Stock standard solutions were prepared in water. Working standard solutions were made by appropriate dilution of the stock standard solutions in water. For sonication, an ultrasonic bath from Sonitech (Bitburg, Germany) was used.

Instruments

The nanochromatographic system used consisted of a nanopump (Agilent, 1260 Infinity) and UV-Vis diode array detector (Agilent, 1200 series) equipped with a 80 nL flow cell. For the separation of the analytes, a Zorbax 300SB C18 (50 mm x 0.075 mm i.d., 3.5 μm particle size) analytical column (Agilent) was used. An additional LC isocratic capillary pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) completed the system. The mobile phase was a mixture of 50:50 (v/v) acetonitrile/water at a flow rate of 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ for the nanopump. As for the capillary pump, 10:90 (v/v) acetonitrile/ water at a fixed flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ was used in order to transfer the sample to valve 2 (see Figure 1 in the manuscript). All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) and sonicated during 30 min before use. The injection system is discussed in the manuscript.

The capillary chromatographic system used consisted of a LC isocratic capillary pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) and UV-Vis diode array detector (Agilent, 1200 series) equipped with a 80 nL flow cell. For the separation of the analytes, a Zorbax SB C18 (150 mm x 0.5 mm i.d., 3.5 μm particle size) analytical column (Agilent) was used. The mobile phase was programmed in gradient mode: acetonitrile/water 70:30 (v/v) for the first 4 min, changed to 50:50 at 5 min and kept constant for the next 10 min at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) and sonicated during 30 min before use. For achieving IT-SPME-Cap-LC coupling, one of the different synthesized capillary columns was connected to a conventional 6-port injection valve (Rheodyne, 7725 model) and used as the injection loop. For sample injection, a 500 μL precision syringe was used.

The detector for both systems was coupled to a data processing and acquisition system (Agilent, HPLC ChemStation). The analytical signal was recorded between 190 and 400 nm. The UV-Vis spectrum of diclofenac was used for identification. Chromatograms were obtained at 280 nm which corresponds to the wavelength of maximum absorbance for diclofenac. All the experiments were carried out in duplicate at room temperature.

For material characterization, scanning electron microscopy (SEM) images were obtained with a HITACHI-S4100 equipment operating at 10 kV. For samples, Au/Pd coating was required.

S2. Capillaries preparation for IT-SPME

Commercial capillary columns of fused silica with 0.075 and 0.100 mm i.d. (Análisis Vínicos, Spain), PDMS TRB-5 and PDMS TRB-35 with 0.100 mm i.d. and stationary phase thickness of 0.1 μm (Teknokroma, Spain) were used after proper modification. Also, PDMS capillary columns were directly used.

Synthesis of Fe_3O_4 -CTAB nanomaterial and functionalization of CNTs. Organic synthesis of Fe_3O_4 NPs is based on the method of Sun and Zeng¹ in which spherical particles of an average diameter of approximately 5 nm are obtained in hexane. Additionally, rod-shaped Fe_3O_4 NPs were obtained from the RTMM group. Then, following the procedure of MINTOTA-RTMM², the hexane extracts (20 mL) of the synthesized Fe_3O_4 NPs (spheres or rods) were mixed with aqueous solutions of 0.1 M CTAB. The resulting aqueous Fe_3O_4 -CTAB colloidal solution was rota-evaporated until complete hexane elimination was achieved.

On the other hand, CNTs (SWCNTs and MWCNTs) must be functionalized in order to be used for a capillary synthesis. CNTs are carboxylated into c-SWCNTs and c-MWCNTs following modified versions of the procedures of Suárez et al.³ and Sombra et al.⁴ respectively: c-SWNTs were prepared by adding SWNTs (25 mg) to a 3:1 (v/v) mixture of H_2SO_4 : HNO_3 (5 mL). The resulting dispersion was sonicated for 90 min and then, after being diluted with water (500 mL), filtrated through a 0.45 μm nylon membrane. Finally, the obtained residue was filtrated with acidified water (using 1 M HCl) and the c-SWNTs were left to dry at room temperature. For c-MWNTs, the procedure was practically the same, except for the initial amounts of MWNTs (20 mg) and H_2SO_4 : HNO_3 mixture (80 mL).

Capillary columns based on SiO_2 /PEG supported CNTs (c-SWNTs). Following a reported procedure⁴, the internal surface of a SiO_2 /PEG capillary column was activated passing 1 M NaOH and water during 10 and 2 min respectively. Then, the capillary was treated with 2% v/v APTS prepared in acetone. APTS excess was eliminated by successive 2 min washes with water and methanol. Later, the capillary was treated with a borate buffer solution (pH 9) with 10% v/v glutaraldehyde. Finally, 5 mg/mL c-SWNTs prepared in DMF (4.5 mL) containing 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (0.5 mg) were passed through the capillary column for 10 min, waiting 1 h to assure CNTs bonding. To eliminate free c-SWNTs, the capillary was washed with water.

Capillary columns based on PDMS TRB-5 supported CNTs (c-SWNTs or c-MWNTs). Internal surface of commercial PDMS TRB-5 capillary columns (0.1 mm i.d.) must be activated in order to achieve the CNT functionalization of the columns. This activation was done in two steps: oxidation and the proper functionalization. First, and following the procedure of Slentz et al.⁵, 5 M NaOH was passed through the capillary for 10 min, waiting 24 h to achieve the complete oxidation.

For the functionalization of the columns, the same procedure⁴ used for the activation and the obtaining of capillary column based on SiO_2 /PEG supported c-SWNTs was performed. However, for PDMS capillary columns, c-MWNTs were also tested. To accomplish this, the only necessary modification was to prepare a DMF dispersion of 5 mg/mL c-MWNTs instead of using c-SWNTs.

Capillary columns based on PDMS-Fe₃O₄ NP gel. Fused silica capillary columns (0.075 mm i.d.) were coated with spherical Fe₃O₄ NPs embedded in a PDMS matrix. For this purpose, SYLGARD® 184 silicon elastomer base and SYLGARD® 184 silicon elastomer currying agents were mixed in a 10:1 (w/w) proportion⁶. Fe₃O₄ NPs (synthesis described in section 2.4.2) were added to the mixture. A gel was obtained. Finally, this gel was passed through a fused silica capillary column previously activated with a 1:1 (v/v) methanol: HCl solution for 30 min.

S3. IT-SPME procedure.

As it was previously stated, standards and samples were directly injected into the capillary column (in IT-SPME-Cap-LC) or the PEEK injection loop and then transferred to the capillary column (in IT-SPME-nano-LC) at 10 μL·s⁻¹ using a 500 μL precision syringe (at full loop capacity). The analytes were adsorbed in the capillary and then desorbed from it progressively as the mobile phase passed through this capillary column. In other words, a dynamic extraction procedure was performed⁷. Finally, the analytes were separated in the analytical column. After each injection, the capillary column (or the PEEK injection loop) was washed with 300 μL of methanol.

S4. Complementary studies

Transfer time optimization

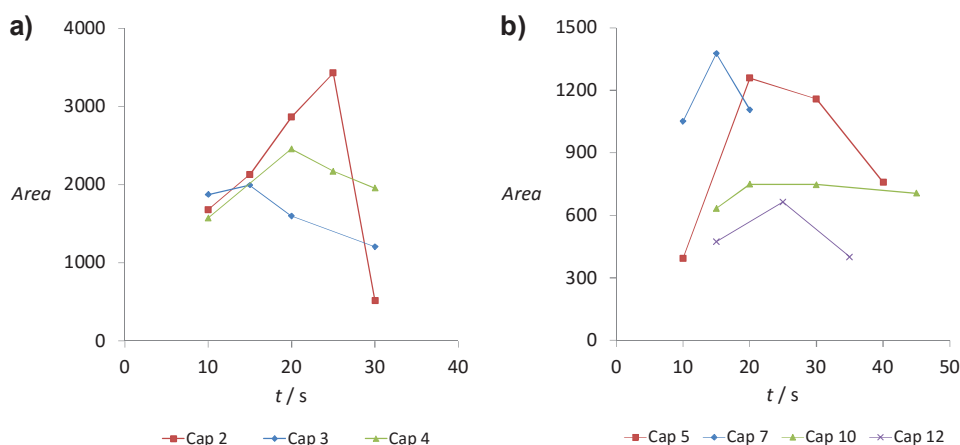


Figure S1. Transfer time optimization. a) PDMS based capillary columns. b) Silica based capillary columns. Note: similar profiles are obtained for the rest of the tested capillaries. Capillary 1 was similar to 3 (15 s), 6 and 8 to 7 (15 s), 9 and 11 to 10 (20 s). See Table 1 for more explanation.

For clarity of discussion, two groups of capillaries can be distinguished: PDMS and silica-based capillary columns. Some capillaries had the same profiles for transfer time.

Additionally, certain capillaries allowed working with higher flow rates (capillaries 5, 6, 7 and 8) and others with lower flow rates (capillaries 2, 3, 4 and 9) than $0.2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The working pressures were too high when capillary 13 was used, so no further studies were performed with this capillary column. Certain tendencies could be established. Between the two groups, similar variation of transfer times was obtained, with the optimized values ranging from 15 to 25 s. Decreasing the capillary length resulted in shorter transfer times. However, when the internal diameter of the capillary was reduced, the transfer times increased. Nevertheless, this can be explained due to the fact that, under this new condition, flow rates must be reduced as well to avoid system overpressure, thereby stretching the transfer times.

IT-SPME Capillaries

Table S1. Characteristics of the different capillary columns tested in IT-SPME-nano-LC and IT-SPME-Cap-LC.

Capillary	Adsorbent phase	~Adsorbent thickness (μm)	Transfer Time (s)	Flow rate ^a ($\mu\text{L}/\text{min}$)
Capillary 1	PDMS TRB-5	1	15	0.2
Capillary 2	PDMS TRB-5 c-SWNTs	1	25	0.1
Capillary 3	PDMS TRB-5 c-SWNTs	1	15	0.1
Capillary 4	PDMS TRB-5 c-MWNTs	1	20	0.1
Capillary 5	SiO ₂ /PEG spherical Fe ₃ O ₄	10	20	0.3
Capillary 6	SiO ₂ /PEG spherical Fe ₃ O ₄	10	15	0.3
Capillary 7	SiO ₂ /PEG spherical Fe ₃ O ₄	10	15	0.2
Capillary 8	SiO ₂ /PEG c-SWNTs	10	15	0.3
Capillary 9	SiO ₂ /PEG spherical Fe ₃ O ₄	10	20	0.05
Capillary 10	SiO ₂ /PEG spherical Fe ₃ O ₄	10	20	0.05
Capillary 11	SiO ₂ /PEG rod-shaped Fe ₃ O ₄	10	20	0.05
Capillary 12	SiO ₂ /PEG	1	25	0.2
Capillary 13	PDMS-Fe ₃ O ₄ gel	10	25	0.05
Capillary 14 ^b	SiO ₂ /PEG spherical Fe ₃ O ₄	10	-	-

^afor the nanopump; ^bcapillary tested only in IT-SPME-Cap-LC

S5. Sample analysis

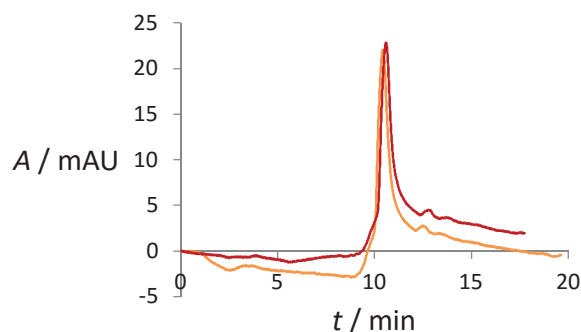


Figure S2. IT-SPME-nano-LC chromatograms using capillary 7 as capillary column of conveniently diluted pharmaceutical samples (Voltaren, $n=2$).

Sample analysis is described in the manuscript's section "Results and discussion".

S6. References

- (1) S. Sun, H.J. Zeng, Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 8204-8205.
- (2) Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, Antonio Ribera, Eugenio Coronado, P. Campíns-Falcó, Magnetic in-tube solid phase microextraction. *Anal. Chem.* 84 (2012) 7233-7240.
- (3) B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 203-207.
- (4) L. Sombra, Y. Moliner-Martínez, M. Valcárcel, Carboxylic multi-walled carbon nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 29 (2008) 3850-3857.
- (5) B.E. Slentz, N.A. Penner, E. Lugowska, F. Regnier, Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane). *Electrophoresis* 22 (2001) 3736-3743.
- (6) I.S. Park, E. Heo, Y.S. Nam, C.W. Lee, J.M. Kim, Colorimetric detection of aliphatic primary amines and a molecular logic gate based on a photochromic phenoxyquinone derivative. *J. Photochem. Photobiol.* 238 (2012) 1-6.
- (7) P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Lagua, Y. Moliner-Martínez, In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2695-2702.

Anexo 8.

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by combining ultrasound-assisted extraction and in-valve in-tube solid-phase microextraction.

González-Fuenzalida, R. A., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P.

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by combining ultrasound-assisted extraction and in-valve in-tube solid-phase microextraction

R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Abstract

This study shows a new procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine sediments based on the combination of ultrasound assisted extraction (UAE) and in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) coupled online to liquid chromatography with fluorescence detection. Different UAE conditions such as the type and volume of the extraction solvent, the sonication time and the extraction temperature have been assayed. The possibility of processing directly the extracts obtained from the UEA into the extraction capillary of the IT-SPME using an on-valve configuration has also been evaluated. Under optimized conditions the described approach allows the determination of PAHs at concentrations ranging from 3.3 to 33.3 ng/g with suitable linearity, reproducibility and accuracy, and limits of detection within the 0.03-0.5 ng/g range. The proposed method combines simplicity of UAE and the high sensitivity attainable by the in-valve IT-SPME, and it is very cost-effective and environmentally friendly, as only 1.2 mL of extraction solvent per sample are required. The reliability of the proposed approach has been tested by analysing naturally contaminated sediment samples.

Keywords: ultrasound assisted extraction, in-valve in-tube solid-phase microextraction, polycyclic aromatic hydrocarbons, marine sediments

*- Corresponding author:

Tel.: + 34 963544034; Fax: + 34 963544436; E-mail: jorge.verdu@uv.es

1. Introduction

During the past decades many efforts have been focused on the development of miniaturized extraction and preconcentration techniques which minimize the consumption of solvents and reagents, and well as the generation of wastes, while providing high levels of sensitivity and selectivity. As a result, many innovative microextraction approaches have been developed including solid-phase microextraction (SPME) with fibers or with capillary columns (in-tube SPME, IT-SPME), hollow fibre liquid-phase microextraction (HF-LPME), stir bar sorptive extraction (SBSE), single drop microextraction (SDME), liquid-liquid microextraction (LLME), dispersive LLME (DLLME) and others. Whereas in many cases such techniques allow the direct analysis of traces of organic compounds in gas, liquid and viscous samples, solid and semi-solid samples require a previous sample treatment to release the target compounds from their native matrix. Modern treatments proposed for solid and semi-solid samples include matrix solid-phase dispersion (MSPD), pressurized liquid extraction (PLE), microwave assisted extraction (MAE) and ultrasound assisted extraction (UAE).

In the context of green extraction techniques UAE is one of the most promising approaches as demonstrated by the increasing number of publications that use it as a cost-effective and efficient alternative to classical treatments [1]. This technique is based on the application of ultrasound waves with appropriate frequencies to produce negative pressures and bubble cavities in the sample. When the bubbles can no longer adsorb more energy they implode (cavitation) creating points with high pressures and temperatures. This facilitates the removal of the analytes from the sample matrix making the extractions faster and more efficient. Depending on the complexity of the sample matrix and concentration of the target compounds in the extracts, further purification and/or enrichment steps may be necessary after UAE. For this purpose classical treatments such as liquid-liquid (re)extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) are generally used, but in the last years there is clear trend to replace them by some form of microextraction. However, most of the methods that combine UAE and microextraction still deal with the analysis of liquid samples. For example, UAE has been used to enhance the extraction yields of DLLME and HF-LPME [2]. The employment of ultrasounds can also be advantageous under specific extraction conditions. This is the case of the so-called ultrasound-assisted emulsification microextraction (USAEME), which uses a water-immiscible extraction solvent to form an emulsion under the assistance of ultrasound waves. In such a way, the employment of a dispersive solvent is avoided, which is an advantage over DLLME [3]. In contrast, the analysis of solid samples by UAE and microextraction has so far received little attention [4]. In other words, the potential advantages of simplified (micro)extraction techniques for processing UAE extracts obtained from solid samples have not been sufficiently explored.

Among the novel microextraction techniques developed in the last decades IT-SPME has emerged as one of the most attractive options, especially in combination with liquid chromatography, as clean-up, analyte enrichment and separation can be carried out in on-line mode. This approach has been generally used for the direct analysis of aqueous matrices but it is increasingly used in the analysis of solid samples [5, 6]. For example, we have demonstrated that IT-SPME can be used to process the extracts obtained from solid samples treated by MSPD. For this purpose, a segment of a commercially available gas column (extractive capillary) was used as the loop of the injection valve of a liquid chromatograph. This configuration (in-valve IT-SPME) allows the processing of a volume of the extracts obtained after MSPD as large as necessary until sufficient analyte is trapped, so the desired sensitivity is reached. The enriched analytes are subsequently transferred to the analytical column by changing the valve position. The reliability of this approach has been illustrated for the analysis of different classes of pollutants in sediments and biota samples [7-9].

In the present work we have tested for the first time the possibility of using in-valve IT-SPME to process the extracts obtained after UAE. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been selected as target compounds, as they are ubiquitous pollutants that have to be controlled in different environmental matrices. In a recent study, we developed a procedure for the determination of PAHs in marine sediments which combined MSPD and in-valve IT-SPME. The proposed method was successfully applied to the quantification of PAHs at ng/g levels, although extensive purification of the MSPD sorbents was necessary to achieve accurate results [10]. Therefore, the combination of UAE and IT-SPME may be an alternative to the MSPD/IT-SPME approach by taking advantage of the simplicity and efficiency of UAE.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. A PAH calibration MIX (Supelco, Bellefonte, PA, USA) containing the 16 PAHs recognised as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA) was used throughout the study. This mixture contained: naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene, benzo[g,h,i]perylene and indene[1,2,3-cd]pyrene in acetonitrile (10 µg/mL each compound). The mixture also contained acenaphthylene which was not included in the present study because it could not be detected by fluorescence. Working solutions of the tested PAHs were prepared by dilution of the stock solutions with acetonitrile. All solutions were stored in the dark at 4°C.

Acetonitrile and ethanol were of HPLC grade (Romil, Cambridge, UK). Methanol and acetone were obtained from Teknokroma (Barcelona, Spain) and isopropanol from Carlo Erba (Rodano, Italy). Ultrapure water was obtained from a Nanopure II (Sybron, Barnstead, United Kingdom) system.

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a thermostated column compartment (Hewlett-Packard 1100 Series), a high-pressure six-port injection valve (Rheodyne Model 7000), and a programmable fluorimetric detector (Hewlett-Packard, 1100 Series). The detector was linked to a data system (Hewlett-Packard, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation. The temperature of the column compartment was set at 30°C. For IT-SPME the stainless steel loop of the injection valve was replaced by a TRB-35 (65% polydimethylsiloxane-35% polydiphenylsiloxane) capillary column (90 cm length x 0.32 mm i. d., 3-µm film thickness) obtained from Teknokroma. Capillary connections to the valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing (Tecnokroma); 1/16 in PEEK nuts and ferrules (Teknokroma) were used to complete the connections.

Conditions used for chromatographic separation of the PAHs were similar to those previously described in [10]. A LiChrospher PAH, 250 mm × 4.6 mm i. d, 5 µm (Merck, Darmstadt, Germany) column was used for separation. The initial composition of the mobile phase was water-methanol-acetonitrile 20:60:20 (v/v/v). This composition was kept constant until 8 min; then, the acetonitrile content was increased to reach 100 % at 16 min, and then kept

constant until the end of the chromatographic run. The mobile-phase flow rate was 0.8 mL/min in the 0-8 min time interval; then, the flow rate was linearly increased up to 1.5 mL/min at 16 min, and maintained constant until the end of the run. The solvents were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma) and degassed with helium before use.

The programmable fluorimetric detector allowed the simultaneous registration of four different signals at one excitation wavelength and four emission wavelengths, so it was programmed to measure the fluorescence at the excitation and emission wavelength that provided best intensities for each compound. The excitation wavelength was set at 235 nm in the 0-7 min time interval in order to achieve maximum response for naphthalene; from 7.0 min until the end of the run, the excitation wavelength was set at 265 nm. Emission wavelengths were 335 nm, 375 nm, 425 nm and 475 nm in the 0-10.5 min interval; from 10.5 min until the end of the run 515 nm instead of 335 nm was selected (the other three wavelengths were the same throughout the run). Calculations for each PAH were done at its optimum excitation/emission wavelength: 235 nm/335 nm for naphthalene, 265 nm/335 nm for acenaphthene and fluorine, 235 nm/515 nm indene[1,2,3-cd]pyrene, 265 nm/375 nm for phenanthrene, anthracene, pyrene and chrysene, 265 nm/425 nm for benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene and benzo[g,h,i]perylene, and 265 nm/475 nm for fluoranthene.

2. 3. UAE and IT-SPME

Unless otherwise stated, portions of 0.3 g of the sediment samples were placed in dark glass vials (10 mL) and mixed with 1.2 mL of the extraction solvent. The vials were introduced into an ultrasonic bath (300 W, 40 kHz, Sonitech, Guarnizo, Spain), and ultrasonication was applied for a defined period of time. A circulating water system (Select, Barcelona, Spain) was used during sonication in order to maintain constant the temperature around the vials. After sonication, the vials were centrifuged at 6000 rpm for 5 min, using a EBA 200 HETT/CH centrifuge (Tuttlingen, Germany). Then, 0.8 mL of the supernatants were removed and placed into 10-mL glass vials. According to the results presented in [7] 3.6 mL of purified water were added to the extracts, and aliquots of 3.0 mL of the resulting solutions (4.0 mL for extracts obtained with isopropanol) were manually loaded into the extractive capillary of the IT-SPME device by means of a 1.0-mL precision syringe. Next, 200 µL of water were flushed through the capillary in order to eliminate the solution remaining into it. Finally, the valve was manually rotated so the analytes were desorbed from the coating of the extractive capillary with the mobile-phase, and transferred to the analytical column for separation and detection. After the injection, the valve was turned to the load position and the extractive capillary was cleaned by passing successively 100 µL of acetonitrile and 200 µL of water.

2. 4. Sediment samples

In studies aimed at the optimization of the UAE process a bulk sample (≈ 50 g) was prepared by mixing and naturally contaminated marine sediments obtained from areas with different levels of pollution by PAHs. These sediments samples were provided by the QUASIMEME (Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe program) group (Wageningen, The Netherlands) in the course of interlaboratory exercises. The estimated concentrations of the tested compounds in the prepared sample were in the 5-150 ng/g range.

For method development studies marine sediments collected from different points of the Comunitat Valencia region (Spain) were used. Samples were dried, homogeneized and kept in glass vials at 4 $^{\circ}$ C until analysis.

3. Results and discussion

3.1. Compatibility of the UAE solvents with IT-SPME

As stated earlier, we have developed different procedures for the analysis of organic pollutants in solid samples through the successive employment of MSPD and IT-SPME [6-9]. In those studies acetonitrile was the solvent used for desorption of the target compounds from the MSPD sorbents. In order to facilitate the passage of the analytes to the coating of the extractive capillary, water was added to the MSPD extracts. In such a way, the MSPD extracts could be directly processed by IT-SPME without intermediate evaporation and reconstitution steps. For example, the addition of 3.6 mL of water to 0.8 mL of the acetonitrile extracts collected after MSPD provided highest analytes responses for some PAHs after their extraction from bivalve samples [7].

In the present study, and since in UAE the extraction solvent plays an important role in the efficiency of the extraction, the possibility of processing solutions of PAHs prepared in other water-miscible solvents by IT-SPME was evaluated. Methanol, acetone, isopropanol and ethanol were the solvent tested, and the results were compared with those achieved with acetonitrile. Mixtures of 0.8 mL the organic solvent and 3.6 mL of water [7] were spiked with 50 μ L of a standard solution containing 100 ng/mL of each PAH in acetonitrile, (resulting in a final concentration of 1.12 ng/mL of each compound). Then, aliquots of the spiked solutions were loaded in the in-valve IT-SPME device and chromatographed.

Preliminary experiments showed that the responses (peak areas) observed for a majority of PAHs when processing 3.0 mL of the mixtures isopropanol/water into the IT-SPME capillary were significantly lower than those obtained with the other solvent/water mixtures. When loading 4.0 mL of the working solutions, the peaks areas increased for the isopropanol/water mixture whereas no significant improvement was found for the others solvents tested. Consequently, in further experiments 4.0 mL was the volume processed when assaying isopropanol/water, and 3.0 mL was the volume used for the other solvents tested.

In Figure 1 are depicted the responses obtained for each compound with tested solvents. Since the absolute peak areas obtained for the 15 tested PAHs were quite different, the normalized responses (calculated taking as the reference value the maximum area obtained for each compound) have been depicted. The analytes have been represented in increasing order of retention time, a parameter that can be used as an estimation of their polarity under reversed-phase chromatographic conditions [7]. The results of Figure 1 indicate that all the tested solvents are compatible with the IT-SPME approach. In general, the responses obtained are quite similar for all the tested compounds, but significantly lower peak areas were observed with acetonitrile for the most polar (first eluted) PAHs naphthalene and fluorene.

3. 2. Optimization of the UAE conditions

The effect of the type and volume of extraction solvent, sonication time and temperature on the analyte responses was studied, using portions of a 0.3 g of naturally contaminated marine sediments.

Indeed, increasing the extraction volume for UAE also increases the total amount of the analytes extracted, which has a positive effect on analyte responses in those protocols that involve partial or total solvent evaporation. However, in the present approach the UAE extracts are directly processed in the IT-SPME device. Therefore, the minimum solvent volume should be used in the UAE step in order to avoid excessive dilution of PAHs. For a sample amount of 0.3 g it was found that 1.2 mL was the minimum volume of extraction solvent that ensured that after centrifugation, 0.8 mL could be removed from the vial for subsequent IT-SPME. When the extraction volume was increased to 2.0 mL lower peak areas were observed for all the tested PAHs regardless the extraction solvent, sonication time and temperature used. Consequently, an extraction volume of 1.2 mL was used in further experiments.

The effect of the extraction solvent on the analyte responses for an extraction time of 10 min and 30 °C is depicted in Figure 2. This figure shows both the absolute areas (2a) and the normalized areas (2b). As observed, the highest extraction efficiencies for a majority of analytes were obtained with acetonitrile, especially for the most apolar PAHs. However, with this solvent the responses obtained for the most polar compounds (naphthalene, acenaphthene and fluorene) were significantly lower than those achieved with acetone and methanol. This can be partially explained by the lower efficiency of the IT-SPME obtained with acetonitrile, as stated in the above section. For the most polar compounds, best responses were obtained with methanol. The extraction efficiencies observed for methanol for the most apolar analytes were significantly lower than those achieved not only with acetonitrile but also with acetone. Acetone provided intermediate responses for all the tested compounds (except for naphthalene), whereas ethanol and isopropanol lead to low responses for all PAHs.

The effect of the extraction time on the responses was evaluated in the 10-60 min interval. The results obtained for the three solvents that provided the highest responses in the previous study (methanol, acetone and acetonitrile) at a temperature of 30 °C are depicted in Figure 3. As observed, increasing the extraction time has a positive effect on the responses up to 30 min, and then, no significant improvement was found by extending the extraction time to 60 min. On the other hand, similar peak areas were found at 30 °C and 40 °C for most of the tested PAHs; a further increment up to 50 °C had a negative effect of analyte responses (Figure 4). According to the literature, high extraction times and/or temperatures cause a reduction in the size of organic matter particles that may be present in the samples, and then in their surface

area, which in turns which facilitates the adsorption of PAHs onto them [11]. This could explain the low efficiencies observed in the IT-SPME under the highest temperature and sonication times assayed.

Finally, since none of the solvents provided the highest responses for both polar and apolar PAHs simultaneously, different solvent mixtures were assayed for extraction temperature of 30 °C and an extraction time 30 min. In general terms, the employment of a mixture acetonitrile and acetone (1:1, v/v) provided the best responses for a vast majority of the tested PAHs. It was also found that the presence of a small percentage of isopropanol in the extraction mixture reduced the presence of background compounds in the resulting chromatograms [Figure 1S, supplementary data].

On the basis of the above results, the conditions finally selected were as follows: samples (0.3 g) were sonicated in the presence of 1.2 mL of acetonitrile-acetone-isopropanol (47.5:47:5, v/v/v) for 30 min at 30 °C. After centrifugation, 0.8 mL of the supernatant were mixed with 3.6 mL of water. Finally, 3.0 mL of the resulting mixture were directly introduced into the IT-SPME device for enrichment, clean-up, separation and detection.

3.3. Validation of the method

In order to evaluate the performance of the proposed method, different marine sediments were analysed. Portions of some of these samples (0.3 g) were spiked with known concentrations of the tested analytes to give concentrations up to 3.3-33.3 ng/g and then subjected to the proposed UAE/IT-SPME procedure to obtain relevant analytical parameters such as linearity, recovery, reproducibility, and limits of detection and quantification (see Table 1). It has to be mentioned that under such conditions, the concentration of each PAH in the solutions to be processed by IT-SPME ranged from 0.15 to 15.0 ng/mL, for a 100 % theoretical recovery. None of the PAHs included in the present study was found in the tested sediments at concentrations above their limits of quantification (LOQs) except naphthalene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene, which were present in most of the samples assayed (see Figure 5); benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene at concentrations below their LOQs were also found in all samples tested.

As observed in Table 1 the linearity was satisfactory for all the tested compounds up to concentrations of 10 ng/g. These are concentrations expected in real sediments with low-moderate pollution by PAHs. However, depending of the origin and degree of pollution higher concentrations can be found [12, 13]. In highly polluted sediments, a reduction in the sample size may be necessary in order to prevent the saturation of the detector, especially for those compounds which exhibited more intense fluorescence such as fluorene and benzo[k]fluoranthene (see Table 1). Under the proposed conditions, no significant differences

were observed when processing 0.1g and 0.3 g spiked to contain the same amount of PAHs. Additionally, for analytes showing peak areas higher than the upper limits of the calibration curves, the extracts obtained by UAE have to be properly diluted with acetonitrile-acetone-isopropanol (47.5:47:5, v/v/v) to adjust the concentrations of PAHs (< 33 ng/mL) before IT-SPME.

The reproducibility was also satisfactory for most compounds taking into account the concentrations assayed. The coefficients of variation (CVs) for most compounds were < 25 %, with only exception of naphthalene. The high CV value observed for this compound can be explained by the fact that the instrumental noise at the corresponding excitation and emission wavelengths was much higher than the noise observed at the excitation/emission wavelengths used for the other PAHs.

The recovery percentages were calculated by comparing the slopes of calibration obtained for the spiked samples (Table 1) with those obtained by processing directly into the IT-SPME extractive capillary standard solutions containing an equivalent concentration of each PAH, which were concentrations in the 0.13-1.3 ng/mL range. The extraction recoveries were also adequate, being the calculated values close or higher than 85 % for most PAHs (see also Table 1). Nevertheless, the extraction efficiencies showed a tendency to decrease as the polarity of the analytes decrease. The responses obtained for the spiked sediment samples were also compared with those obtained from the direct injection of 20 μ L of standard solutions in order to calculate the overall recoveries [Table S1, supplementary data]. The absolute recoveries were in the 25% - 51 %, which are satisfactory values taking into account that extractions in the in-valve IT-SPME modality are not exhaustive; these values are consistent with those previously reported [6]. Table 1 also shows the LODs and LOQs, established from the calibration equations, which were in the 0.03-0.5 ng/g and in the 0.1-1.5 ng/g interval, respectively.

The proposed conditions were applied to the determination of PAHs in a marine sediment in the course of a interlaboratory study. In this study a consensus value was set for each analyte from the results reported by the participating laboratories. Instead of by the standard deviation, each result was characterized by a total error composed by a proportional error (a value of 12.5% for all analytes) and a constant error which ranged between 0.05 and 0.5 ng/g, depending on the analyte. The true value lied in the interval consensus value ± 2 *total error. The same criteria have been applied to the data obtained for the sample analysed by the proposed method. In Table 2 are summarized the results obtained. As it can be seen in this table, results obtained by the proposed method are statistically equivalent to the consensus values for all the determined analytes, with the only exception of phenanthrene. Therefore, it can be concluded that the proposed method provides suitable accuracy.

3.4. Utility of the proposed procedure

The determination of traces of PAHs in soils and sediments has been traditionally carried out using Soxhlet extraction followed by post clean-up by SPE or LLE, but in the last years alternative treatments are increasingly used, being PLE the most commonly used technique. Under such methodology the accurate determination of PAHs at low ng/g levels is possible, but substantial sample handling is still required [14, 15]. Recently, Choi et al proposed a method for the determination of PAHs in marine sediments (5 g) that integrated PLE extraction and clean-up [16]. For this purpose, the extraction cell was packed with 5 g of activated silica and 5 g of activated copper, as well as diatomaceous earth to minimize the cell dead volume. After extraction, the collected extracts were partially evaporated and analysed by GC-MS. The LODs reported were in the 0.04-0.77 ng/g. Similar LODs were reported in [13] by using pressurized hot water extraction followed by SPME with polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fibres. Comparable sensitivity was reached by subjecting the sediments to MAE followed by SPE [12]. Another alternative recently proposed for the analysis of PAHs in soils is flotation assisted homogeneous liquid-liquid extraction [17], again using a home-designed microextraction cell and similar sensitivity; the LODs obtained by GC ranged from 24 to 30 ng/g. Very recently, the determination of PAHs from soil samples by HS-SPME has been reported using special devices to promote the release of the target analytes from the sample. This is the case of the method described in [18], in which vacuum was applied to increase HS-SPME efficiency by using a custom-made extraction device and PDMS fibres. The LODs for spiked sand samples ranged from 0.003 to 0.233 ng/g. A cooling/heating HS-SPME device has been described in [19] for the extraction of PAHs from contaminated soils, again with PDMS fibres. The analysis of the extracted PAHs by GC-FID led to LODs in the 0.47-0.89 ng/g interval.

Most of the methods that involve USA have been proposed for analysis of PAHs from water [20, 21]. Wang et al [22] described a procedure for the determination of PAHs in soil based on subjecting the sample to two consecutive UAE; then, the combined extracts were evaporated to almost dryness and then reconstituted with a mixture of 100 μ L of acetone and 15 mL of water. The final solutions were subsequently treated by HS-SPME using PDMS fibres. The LODs found using GC-MS ranged from 2 to 20 ng/g.

As it can be deduced, the analytical performance of the proposed method is comparable to that reported in other published methods. The main advantage of the proposed approach is that the extracts obtained can be directly processed making unnecessary additional evaporation or reextraction steps. The instrumentation required is very simple, especially when compared with PLE or with methods that involved home-made designed extraction devices.

Compared with the previously described MSPD/IT-SPME [10], the main advantage of the present procedure is that sample handling is drastically reduced. MSPD method involves manually ground of the sample and a sorbent used for sample disruption, followed by the transfer of the resulting mixture to a SPE extraction tube, and the subsequent desorption of the analytes. In addition, the sorbents have to be extensively cleaned to avoid interferences caused for the contaminants when traces of PAHs are going to be determined. The UAE is more time consuming but several samples can be simultaneously placed into a ultrasonic bath for the extraction. Also, the consumption of organic solvents and materials is drastically reduced. In the MSPD requires sorbents, extraction tubes, and organics solvents for cleaning and conditioning the sorbent and desorption of the analytes from the extraction tubes. In the UAE/IT-SPME approach only 1.2 mL of extraction solvent and 3.6 mL of water per sample are necessary. Finally, the extractive capillary can be reutilised simply by flushing through it 100 μ L of acetonitrile followed by 200 μ L of water after processing a sample. In the course of our study the same capillary was used for more than one hundred injections without observing a deterioration of its extraction performance.

4. Conclusions

The combination of UAE and in-valve IT-SPME is a reliable alternative for the analysis of PAHs in marine sediments. The proposed USA conditions allow the efficient extraction of the target compounds using small amount of the samples (0.1-0.3g) and only 1.2 mL of organic solvent per sample. The extracted PAHs can be further purified and concentrated by IT-SPME in an in-valve configuration simply by adding water to the UAE collected extracts. The analytical performance of the proposed method is similar to that reported by other methods proposed recently for the determination of PAHs in soils and sediments. The main advantage of the proposed approach is that the consumption of materials and reagents is considerable reduced and no especially extraction devices have to be designed. Compared with the MSPD/IT-SPME approach, the proposed method significantly reduces sample handling as well as the consumption of solvents and materials.

This study has also shown for the first time that IT-SPME in an on-valve configuration is compatible with extraction solvents of different polarities and viscosities, provided that those solvents are miscible with water. Therefore, the UAE /in-valve IT-SPME approach could be used for a variety of solid matrices and analytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad for the financial support received (project MINECO-FEDER CTQ2014-53916-P).

REFERENCES

- [1] B. K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 100-109.
- [2] A. Szreniawa-Sztajnert, B. Zabiegała, J. Namieśnik, Developments in ultrasound-assisted microextraction techniques for isolation and preconcentration of organic analytes from aqueous samples, *Trends Anal. Chem.* 49 (2013) 45-54.
- [3] J. Regueiro, M. Llompарт, C. Garcia-Jares, J. C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A*, 1190 (2008) 27-38.
- [4] J. Moreda-Piñeiro, A. Moreda-Piñeiro, Recent advances in combining microextraction techniques for sample pre-treatment, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 265-274.
- [5] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 926-950.
- [6] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Recent advances in in-tube solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 205-213.
- [7] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, New micromethod combining miniaturized matrix-solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 13-21.
- [8] M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, S. Cogollos-Costa, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, A miniaturized method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in bivalves as bioindicators, *J. Chromatogr. A* 1260 (2012) 169-173.
- [9] M. Muñoz-Ortuño, A. Argente-García, Y. Moliner-Martínez, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, M. T. Picher, P. Campíns-Falcó, A cost effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal-sediments, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 57-63.

- [10] Y. Moliner-Martínez, R. A. González-Fuenzalida, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: Application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments. *J. Chromatogr. A* 1263 (2012) 43-50.
- [11] D.L. Stephens Jr., T. McFadden, O.D. Heath, R.F. Mauldin, The effect of sonication on the recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal stack ash surfaces, *Chemosphere* 28 (1994) 1741–1747.
- [12] C. González-Piñuela, R. M. Alonso.-Salces, A. Andrés, I. Ortiz, J. R. Viguri, Validated analytical strategy for the determination of polycyclic aromatic compounds in marine sediments by liquid chromatography coupled to diode-array detection and mass-spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1129 (2006) 189-200.
- [13] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, *J. Chromatogr. A* 1196 (2008) 65-72.
- [14] E. Martínez, M. Gros, S. Lacorte, D. Barceló, Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 181-188.
- [15] M. R. Burkhardt, S. D. Zaugg, T. L. Burbank, M. C. Olson, J. L. Iverson, Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and alkylated PAH homolog groups in sediment, *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 104-116.
- [16] M. Choi, Y.-J. Kim, I.-S. Lee, H.-G. Choi, Development of a one-step integrated pressurized liquid extraction and cleanup method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments, *J. Chromatogr. A* 1340 (2014) 8-14.
- [17] M. H. Hosseini, M. Rezaee, H. A. Mashayekhi, S. Akbarian, F. Mizani, M. R. Pourjavid, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples using flotation-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 52-56.
- [18] E. Yiantzi, N. Kalogerakis, E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples, *Anal. Chim. Acta* 890 (2015) 108-116.
- [19] A. R. Ghiasvand, M. Pirdadeh-Beiranvand, Cooling/heating-assisted headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils, *Anal. Chim. Acta* 900 (2015) 56-66.
- [20] A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, M. Rezaee, M. Ghambarian, Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents

followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6673-6679.

- [21] J. Cheng, G. Matsadiq, L. Liu, Y.-W. Zhou, G. Chen, Development of a novel ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2476-2482.
- [22] Y. Wang, J. Zhang, Y. Ding, J. Zhou, L. Ni, C. Sun, Quantitative determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples using solid-phase microextraction, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3951-3957.

Figure captions

Figure 1. Normalized peak areas obtained for solutions of the tested PAHs (1.12 ng/mL) in different solvent/water mixtures processed by IT-SPME. Volume processed, 4.0 mL for isopropanol/water and 3.0 mL for the others solvent/water mixtures. For other details, see text.

Figure 2. Responses obtained for a naturally contaminated marine sediment processed by UAE with different solvents: (a) absolute peak areas and (b) normalized peak areas. Conditions: extraction time, 10 min; extraction temperature, 30 °C. For other details, see text.

Figure 3. Responses obtained for a naturally contaminated marine sediment processed by UAE with different extraction times for: (a) methanol, (b) acetone and (c) acetonitrile. Extraction temperature, 30 °C. For other details, see text.

Figure 4. Responses obtained for a naturally contaminated marine sediment processed by UAE with different extraction temperatures for: (a) methanol, (b) acetone and (c) acetonitrile. Extraction time, 30 min. For other details, see text.

Figure 5. Chromatograms obtained by the proposed USA/IT-SPME method for a marine sediment and the same sediments spiked with PAHs (8.33 ng/g, each compound). Excitation wavelength: 235 nm in the 0-7 min interval and 265 nm from 7.0 min until the end of the run. Emission wavelengths: (A) 335 nm in the 0-10.5 min interval and 515 nm from 10.5 min until the end of the run; (B) 375 nm; (C) 425 nm and (D) 475 nm. Sample, lower chromatograms; spiked sample, upper chromatograms. For other details, see text.

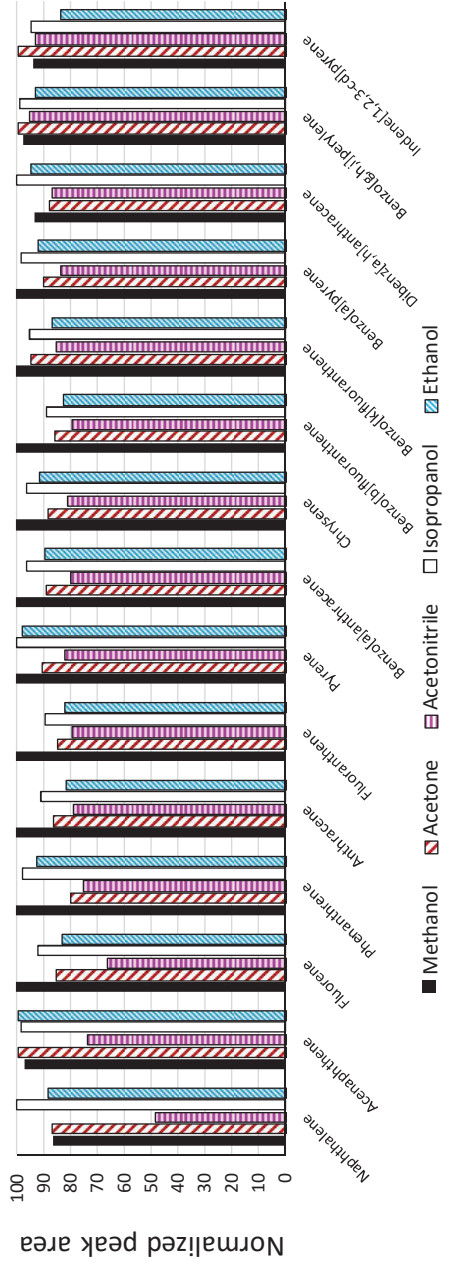


Figure 1

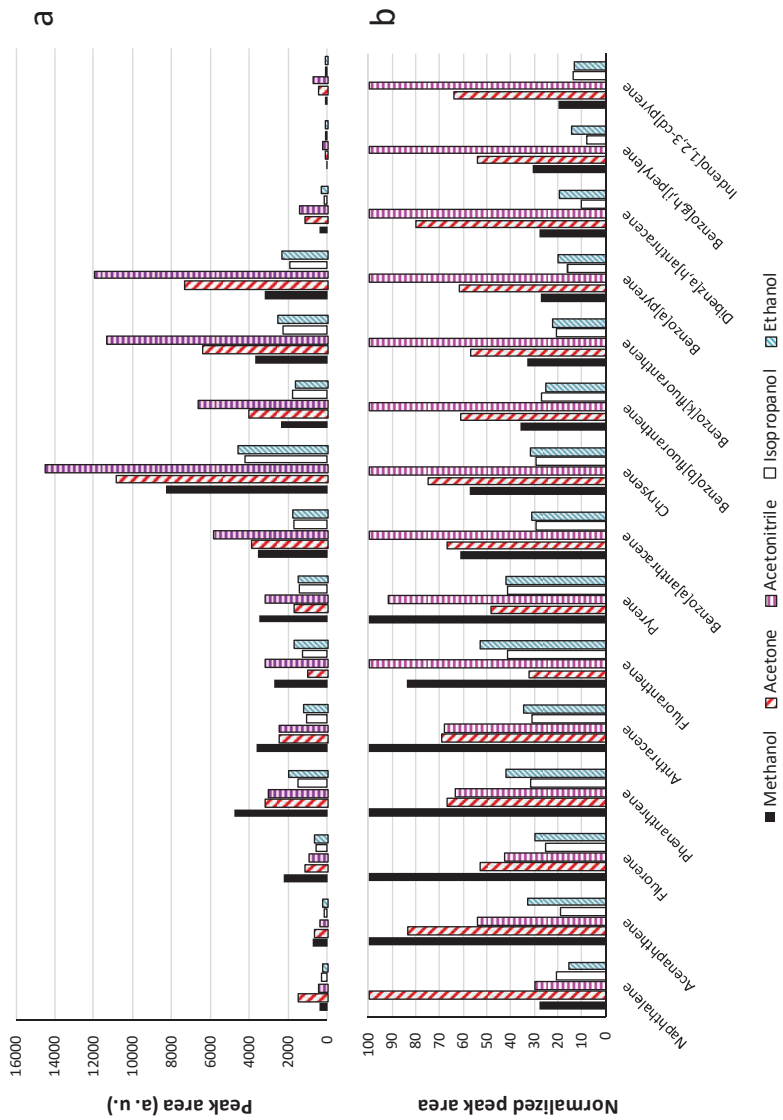


Figure 2

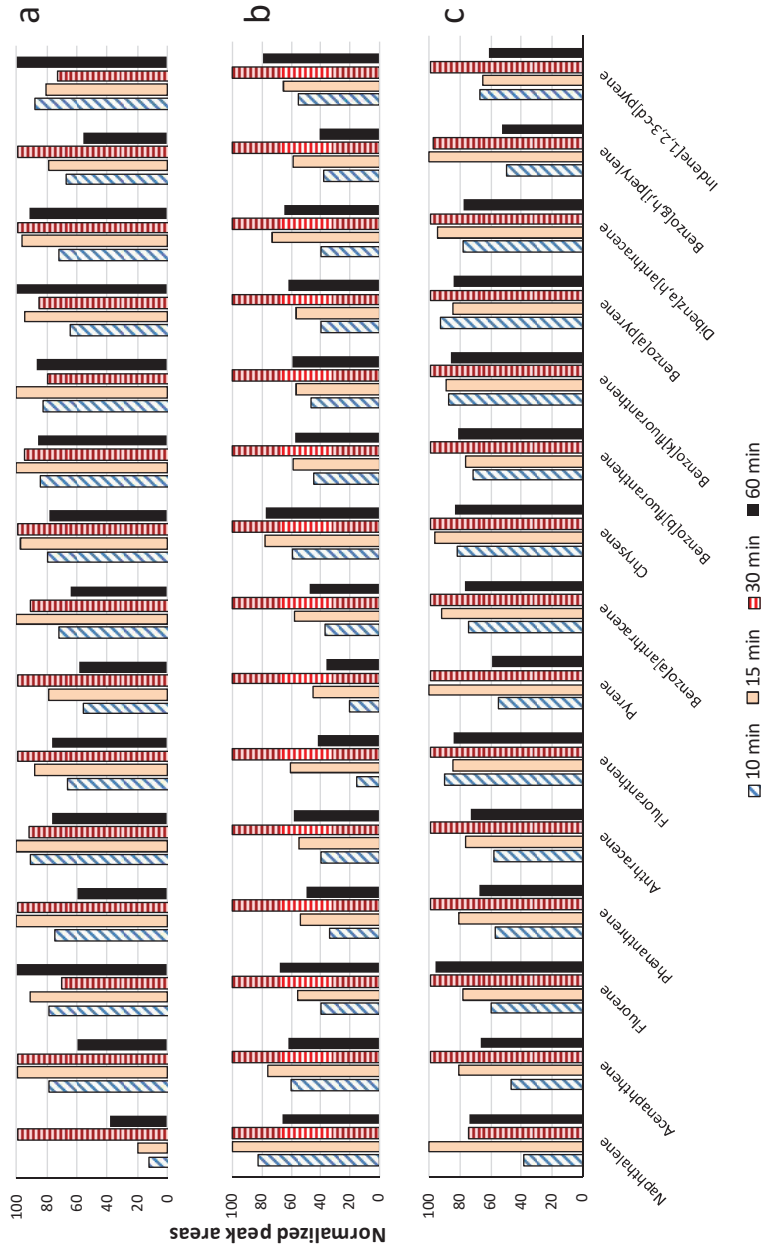


Figure 3

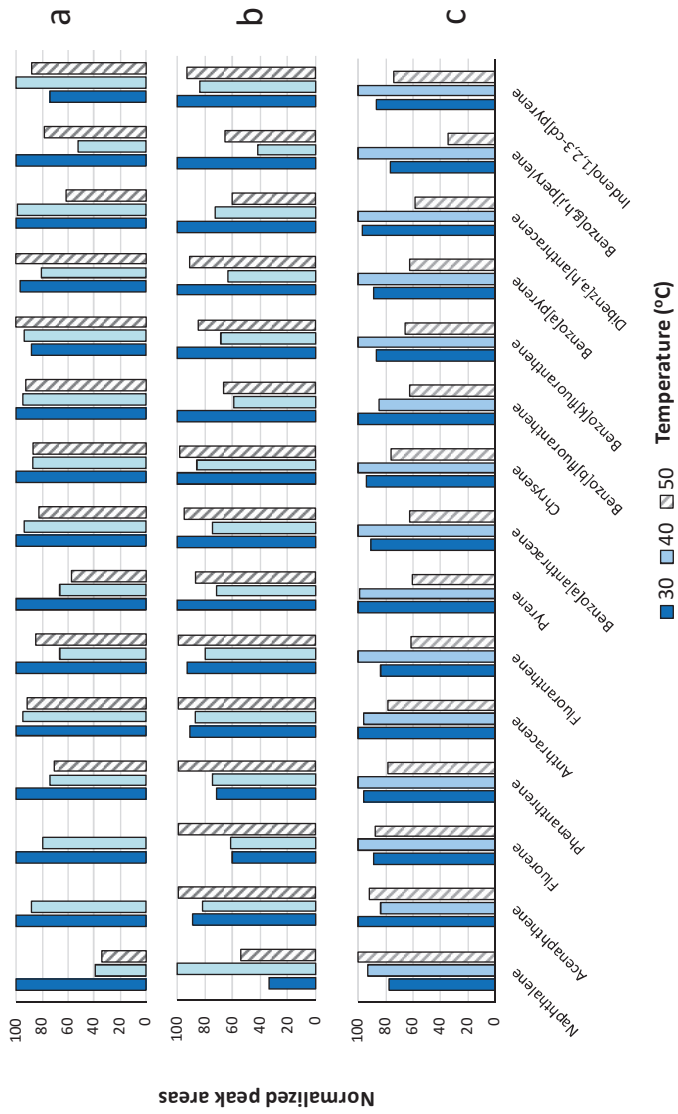


Figure 4

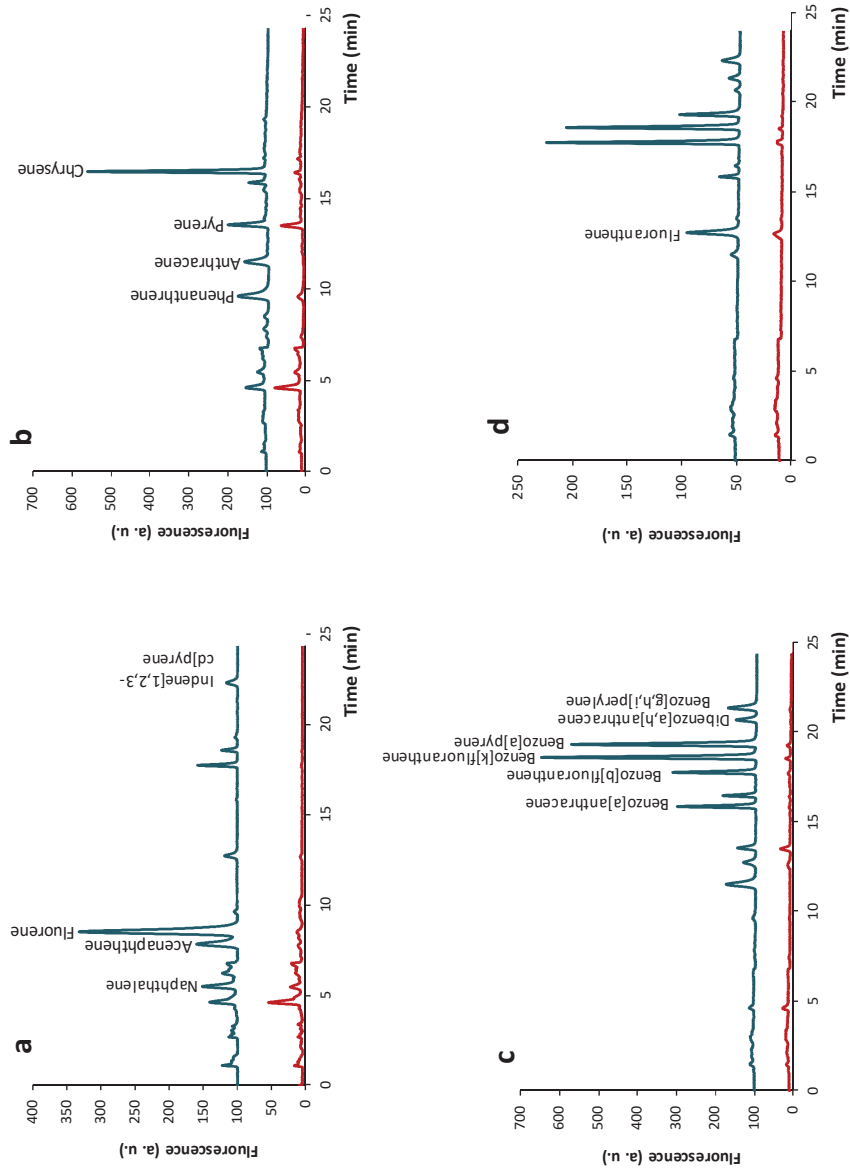


Figure 5

Table 1. Analytical data for the determination of PAHs in marine sediments.

Compound	Linearity ($y = a + bx$) (n=8)			Recovery* (%)	Reproducibility (%, CV) (n=4)	LODs (ng/g)	LOQs (ng/g)
	a	b	r				
Naphthalene	157 ± 23	168 ± 5	0.997	104	39	0.3	1.0
Acenaphthene	110 ± 57	399 ± 12	0.997	110	26	0.2	0.75
Fluorene	-28 ± 137	1713 ± 27	0.999	98	5	0.06	0.2
Phenanthrene	286 ± 69	508 ± 15	0.997	96	10	0.2	1.0
Anthracene	87 ± 143	524 ± 23	0.995	91	6	0.2	0.75
Fluoranthene	156 ± 20	218 ± 4	0.999	102	5	0.3	1.0
Pyrene	498 ± 75	251 ± 16	0.988	85	11	0.2	0.75
Benzo[a]anthracene	177 ± 136	535 ± 24	0.994	96	11	0.06	0.2
Chrysene	434 ± 266	1229 ± 57	0.994	89	15	0.03	0.1
Benzo[b]fluoranthene	199 ± 97	578 ± 18	0.997	91	10	0.06	0.2
Benzo[k]fluoranthene	128 ± 79	1691 ± 40	0.998	89	12	0.03	0.1
Benzo[a]pyrene	769 ± 438	1184 ± 80	0.987	75	19	0.03	0.1
Dibenz[ah]anthracene	93 ± 60	171 ± 13	0.983	84	12	0.2	0.75
Benzo[ghi]perylene	129 ± 79	257 ± 21	0.984	85	24	0.2	0.75
Indene[1,2,3-cd]pyrene	29 ± 16	89 ± 2	0.998	84	9	0.5	1.5

(*) Recovery of the UAE calculated as the ratio between the signals obtained for spiked sediment and for a standard solution containing an equivalent concentration of each PAH and processed directly by IT-SPME.

Table 2. Accuracy for the determination of PAHs in marine sediments.

Compound	Assigned concentration (ng/g)	Total error (ng/g)	Determined concentration, n=3 (ng/g)	Total error (ng/g)
Naphthalene	71	9	46	6
Acenaphthene	14	2	22	3
Fluorene	22	3	14	2
Phenanthrene	118	15	67	9
Anthracene	31	4	46	6
Fluoranthene	147	18	156	20
Pyrene	123	15	130	16
Benzo[a]anthracene	83	10	81	10
Chrysene	69	9	106	13
Benzo[b]fluoranthene	118	15	75	10
Benzo[k]fluoranthene	53	7	40	5
Benzo[a]pyrene	83	10	97	12
Dibenz[ah]anthracene	18	2	19	2
Benzo[ghi]perylene	92	12	60	8
Indene[1,2,3-cd]pyrene	96	12	90	11

Table S1. Absolute recoveries of the UAE/IT-SPME proposed method.

Compound	Absolute recovery* (%)
Naphthalene	33
Acenaphthene	45
Fluorene	45
Phenanthrene	45
Anthracene	40
Fluoranthene	34
Pyrene	42
Benzo[a]anthracene	35
Chrysene	44
Benzo[b]fluoranthene	42
Benzo[k]fluoranthene	34
Benzo[a]pyrene	44
Dibenz[ah]anthracene	40
Benzo[g,h,i]perylene	51
Indene[1,2,3-cd]pyrene	32

(*) Recovery of the UAE/IT-SPME calculated as the ratio between the signals obtained for spiked sediment and for a standard solution containing an equivalent amount of each PAH directly injected in the chromatographic column (volume injected, 20 μ L).

Anexo 8.

Supporting Information

for

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by combining ultrasound-assisted extraction and in-valve in-tube solid-phase microextraction.

Supplementary material

Table S1. Absolute recoveries of the UAE/IT-SPME proposed method.

Compound	Absolute recovery* (%)
Naphthalene	33
Acenaphthene	45
Fluorene	45
Phenanthrene	45
Anthracene	40
Fluoranthene	34
Pyrene	42
Benzo[a]anthracene	35
Chrysene	44
Benzo[b]fluoranthene	42
Benzo[k]fluoranthene	34
Benzo[a]pyrene	44
Dibenz[ah]anthracene	40
Benzo[ghi]perylene	51
Indene[1,2,3-cd]pyrene	32

(*) Recovery of the UAE/IT-SPME calculated as the ratio between the signals obtained for spiked sediment and for a standard solution containing an equivalent amount of each PAH directly injected in the chromatographic column (volume injected, 20 μ L).

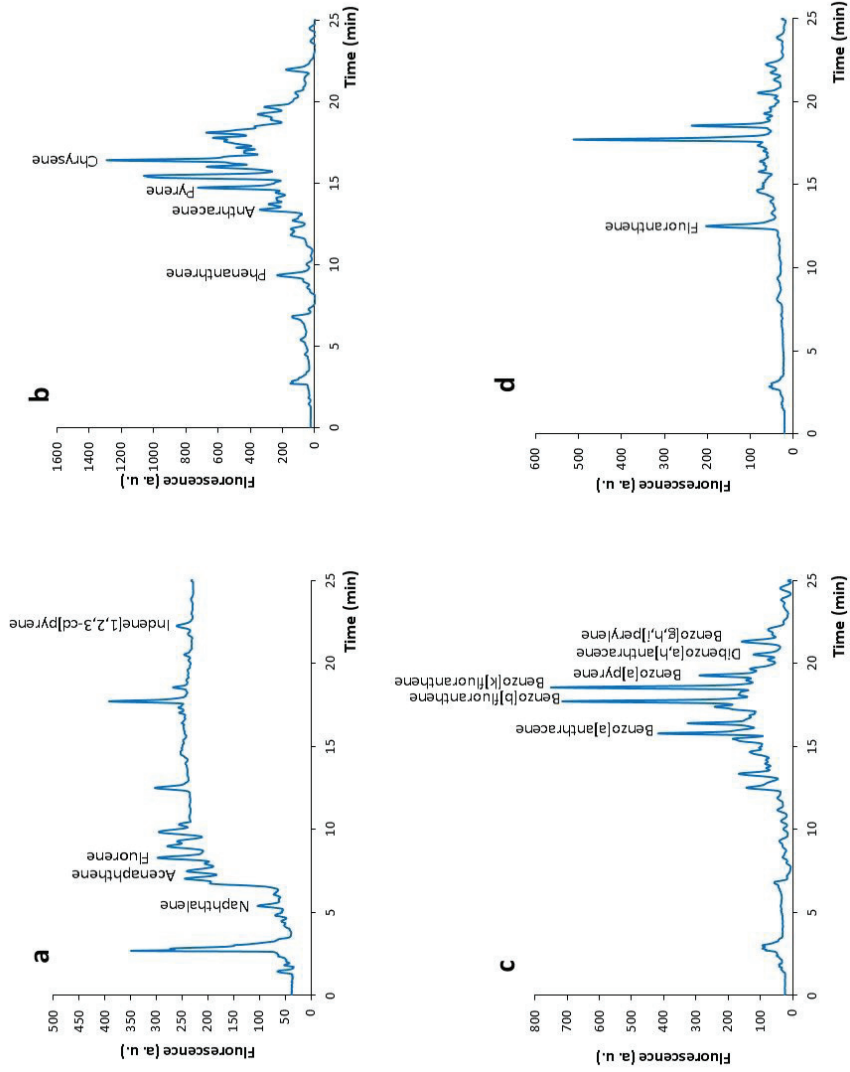


Figure S1. Chromatograms obtained by the proposed USA/IT-SPME method for real marine sediment (0.1 g). Excitation wavelength: 235 nm in the 0-7 min interval and 265 nm from 7.0 min until the end of the run. Emission wavelengths: (A) 335 nm in the 0-10.5 min interval and 515 nm from 10.5 min until the end of the run; (B) 375 nm; (C) 425 nm, and (D) 475 nm. For other details, see text.

Anexo 9.

Study of the adsorption interaction between AgNPs and different soil matrices by in tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography.

González-Fuenzalida, R. A., Moliner-Martínez, Y., Escribano-López, I., Campins-Falcó, P.

Study of the adsorption interaction between AgNPs and different soil matrices by In Tube Solid-Phase Microextraction coupled to Capillary Liquid Chromatography

R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, I. Escribano-López, and P. Campins-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia. Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia. Spain

Abstract

The adsorption interaction between silver nanoparticles (AgNPs) and different soils can be studied by measuring the variations of the surface plasmon resonance band, a characteristic property of metallic NPs. In the proposed methodology, the supernatant resulting from the NP-soil dispersion mix can be analyzed after adding sodium thiosulfate, a reagent that selectively disrupts AgNP absorption in presence of interfering compounds, and thus, retention % of NPs can be quantified by in tube-solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. Through this, a relation between the NP adsorption and soil properties such as the organic matter content and particle size can be established in order to understand how AgNPs behave in a complex environmental matrix.

Keywords: nanomaterials, emerging contaminants, soil, in-tube solid phase microextraction, capillary liquid chromatography

(*) Corresponding author

e-mail address: pilar.campins@uv.es, rodrigo.gonzalez@uv.es

1. Introduction

In the present, the considerable increase of nanomaterials use in daily life has generated a major concern about its impact on the environment. Among these nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs) rank first as the most commercially extended ones [1], explained by the fact that AgNPs have several applications: in the field of electronics [2], catalysis [3], sensors [4] and most notably as an antimicrobial agent [5] in the manufacture of a wide range of consumer-oriented products (CPS) [6]. With this, ecosystems will be more exposed to AgNPs, which, in turn, possess an

inherent toxicity that has been the subject of intense scientific discussion nowadays (recently clarified, for example, by studies on zebrafish embryos [7]). Also they can release Ag^+ , the toxic species per se responsible for the antimicrobial behavior. Although silver toxicity in humans is relative low [8], damage on other species (e.g. aquatic organisms [9]) could have an impact on all the trophic levels of the food chain [10]. Considering these potential risks, analytical methods for identifying, quantifying and characterizing AgNPs in environmental samples are highly required. Moreover, understanding the fate of AgNPs (which can be seen as an emerging pollutant) in such environmental matrices is of primary importance.

During the production and after the use of CPs, AgNPs can get into the soil environment by means of direct or indirect contamination. AgNPs may find their way into soils as a result of direct application of organic pesticides or fertilizers [11, 12]. On the other hand, NPs deposition into soils from air or groundwater can be conceived as an indirect route of contamination [13]. Having reached a particularly soil, NPs can be strongly adsorbed onto it depending on the soil specific properties [14].

Soils are very complex matrices: structural factors such as texture (particle space arrangement within a soil) and particle size distribution (PSD, i.e., the soil grain size composition) determine their physicochemical properties [15]. In turn, these factors depend on mineral composition, chemical nature, moisture, content of salt, among others. Therefore, the number of parameters involved is elevated. Considering AgNP-soil interaction, PSD can easily be seen as a crucial variable for directly conditioning the size of the contact surface between them. Also, the soil content of organic matter (SOM, composed by residual fraction, cellulose, humic and fulvic acids) can play a key role in AgNP adsorption onto soils. In addition, it has been documented that SOM (specifically, humic acids, HAs) promotes the formation of AgNPs under certain

conditions [16]. On the other hand, the soil surface charge can affect NPs retention allowing more or less mobility of the particles if AgNPs bear the same or opposite charges as the soil respectively (e.g. citrate capped AgNPs possess a negatively charged surface and they would be more adsorbed in a positively charged soil) [17]. Summarizing, the soil specific nature induces a unique way to interact with AgNPs due to the large number of factors involved.

For characterizing the AgNP-soil interaction, many different strategies could be adopted. However, in most analytical methods for quantifying AgNPs, an indirect estimation of them is done through total silver or Ag^+ quantification [18]. Here, the selected method must respond to a characteristic property of AgNPs that on the one hand, changes in presence of the soil particles resulting in a direct measurement of the adsorption that occurs and that on the other hand, responds to AgNP concentration. The most used methods for analyzing AgNPs involve microscopy (transmission and scanning electron microscopy, TEM and SEM respectively) and microscopy-related techniques (atomic force microscopy, AFM). TEM can give the AgNP concentration (for quantitative syntheses, the 100% of rate can be confirmed with a colorimetric method [19]) through mathematical calculation using the average particle diameter [20], but a variation of concentration is highly difficult to estimate as a specific and low number of particles (500) are counted (the number of particles will be always superior to 500) for obtaining the concentration. Unless the average particle diameter changed, the calculated concentration value would always be the same.

Recently our research group has developed methods to estimate the average particle diameter of AgNPs by capillary liquid chromatography with UV-Vis detection (diode array detector, DAD) coupled or not to in-tube solid phase microextraction (Cap-LC-DAD and IT-SPME-Cap-LC-DAD) [20]. The signal was recorded at 400 nm, which

corresponds to the absorption maximum of the AgNP surface plasmon resonance (SPR) band. The SPR Band is characteristic for every metallic nanoparticle [21], thus, in this case, a specific property of AgNPs. It was demonstrated that both Cap-LC-DAD and IT-SPME-Cap-LC-DAD responded to AgNP concentration, contrary to direct UV-Vis measurements in which the signal is affected by other parameters (shapes, state of aggregation) [20]. Therefore, for responding directly to an AgNP property (the SPR band) and also to their concentration, Cap-LC-DAD and IT-SPME-Cap-LC-DAD were selected as the methods of analysis (note that in the present work, the average NP diameter is not required to evaluate the adsorption of AgNPs into soils).

For accomplish the present work objective of quantify the AgNP-soil interaction by means of the retention percentage of the particles in this matrix, NP dispersions were mixed with a given soil and studies were carried out on the supernatants after the corresponding sample procedure was performed. Four soils of different origin and nature (compost, mountain, orchard and urban) were chosen for studying AgNP adsorption onto them and establishing relations between the physicochemical properties of the soil and NP retention. Before using Cap-LC-DAD and IT-SPME-Cap-LC-DAD, soils were characterized by Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) and Microscopy.

2. Experimental section

2.1 Chemicals

Silver nitrate (>99%, AgNO₃, Sigma-Aldrich), trisodium citrate (Guinama), hydrogen peroxide (H₂O₂, Panreac) and sodium borohydride (NaBH₄, Fluka) were used for producing AgNPs. Sodium dodecyl sulfate (SDS, >99%, Merck), ammonium acetate (98%, Sigma-Aldrich) and sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃, Merck) were used for

preparing the Cap-LC mobile phase. The water for all the experiments was purified through a Barnstead Nanopure II system.

2.2 Apparatus

UV-visible spectra were registered with a Varian Cary 60 Fiber Optic UV-Vis spectrophotometer. The analytical signal was recorded between 200 and 1000 nm.

AgNP characterization was performed by using transmission electronic microscope (TEM) with a JEM-1010 from Jeol Ltd. Operated at 100 kV. TEM samples were prepared by placing a drop (~10 μ L) of the AgNP suspension onto a carbon-coated copper grid (300 mesh), which was subsequently dried overnight at room temperature. Silver nanoparticle sizes were calculated by using ImageJ and Histogram softwares. The concentration was estimated from TEM experiments as described in the literature [20, 22].

As for soils characterization, scanning electron microscopy (SEM) images were obtained with PHILIPS XL 30 ESEM equipment. SEM quantitative measures were performed with the EDAX microanalysis system incorporated into the microscope. For samples, Au/Pd coating was required. Additionally, images of the different sized soils were obtained using an ECLIPSE E200 Microscope (Nikon). Additionally, ATR-FTIR measurements were performed directly on soils with a Cary 630 FTIR accessory of the Cary 60 spectrophotometer. For sieving the soils, an electromagnetic and digital sieve shaker BA 200N (Cisa) was used.

Chromatographic studies were carried out using an Agilent Technologies High Performance Liquid Chromatography System with a LC capillary binary gradient pump (Agilent 1200 Series), a 2 μ L injection volume valve and diode array detection equipped with a 80 nL flow cell at microflow mode (Cap-LC). For achieving IT-SPME-Cap-LC

coupling, a capillary column of polydimethylsiloxane (PDMS) with 35% of polydiphenylsiloxane (TRB%, Teknokroma) was connected to a conventional 6-port injection valve (Rheodyne, 7725 model) and used as injection loop (0.32 mm i.d.) replacing the 2 μL injection volume valve. A Jupiter C18 (5 μm , 300 \AA , 0.5 mm i.d. x 5 cm) analytical column (Phenomenex) was used. The mobile phase consisted of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, 10 mM), Sodium Thiosulfate (1 mM), Ammonium Acetate (AcNH_4 , 10 mM) at mobile phase flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) and sonicated (Sonitech Ultrasonic Bath) before use.

The detector was coupled to a data processing and acquisition system (Agilent, HPLC Chemstation). UV-Vis spectrum of AgNPs was used for identification. Chromatograms were obtained at 400 nm.

2.3 AgNP syntheses

AgNPs were synthesized using Frank's approach. In this method, silver nanoparticles are prepared by reducing silver ions (Ag^+) with sodium borohydride in presence of citrate anions [23]. For controlling sizes and shapes of the resulting particles, hydrogen peroxide can be added to the mixture [24]. Briefly, trisodium citrate (1.3 mL, 1% w/v), AgNO_3 (0.064 mL, 1% w/v), H_2O_2 (0.1 mL, 30% v/v) and NaBH_4 (0.94 mL, 0.1% w/v) were subsequently added in a 20 mL flask and then, diluted with water to obtain a 5 mL final volume. The reaction mixture was stirred for 15 minutes at room temperature. Finally, the samples were stored and kept in the dark after being adequately diluted with water. For the synthesis blank, the same procedure was followed but no AgNO_3 was added to the mixture.

2.4 Soils samples

Soil samples (compost, mountain, orchard and urban) were collected from different points of the Valencian Community. They were stored in glass bottles at room temperature.

2.5 Soils contamination procedure and sample processing

A quantity of sample (0.1 g) was mixed with AgNPs, synthesis blanks or water (1 mL) constituting 3 series (named A, SB and W). Then, aliquots of the supernatants of each series were taken from time to time, centrifuged (3000 rpm, with an EBA 200 Hettich centrifuge) and passed through 0.45 μm PTFE syringe filter obtaining the final samples. All experiments were carried out in duplicate ($n=2$).

3. Results and discussion

3.1 Soils and AgNPs characterization

ATR-FTIR spectroscopy was selected for characterizing soil samples. No sample preparation was needed as a small amount of a particular soil was directly measured. **Figure 1** shows the obtained IR spectra for each sample. Two groups could be established: in the first one (consisting of compost and mountain soils) and in addition to C-O and Si-O bands (1430 and 1030 cm^{-1} respectively), organic matter compatible vibrations could be distinguished (O-H, C-H and C=O vibrations in the zones around 3200 and 1700 cm^{-1}) due to the presence of SOM (mainly, HAs); in the second one (consisting of orchard and urban soils), the above-mentioned C-O and Si-O bands (commonly associated to the presence of carbonates and clays) could be found, whereas less organic matter was present (with orchard soil having the fewest).

On the other hand, soils (1.0 g) were sieved several times for controlling the particle size composition of each sample. The average composition in terms of 5 fractions (below 100 μm , 100 to 200 μm , 200 to 300 μm , 300 to 400 μm and coarse fraction) for the 4 studied soils are displayed in **Table 1** (Also, further information as

well as Microscope characterization can be found in the **Section 1** of the Supporting Information, SI). If the 2 groups established after ATR-FTIR analysis are considered, it can be stated that for the first one, compost had smaller particles than mountain soil; as for the second group, both orchard and urban soils were very similar in composition.

AgNPs were synthesized following Frank's method (see **Section 2.3**). For characterizing them, TEM and UV-Vis analysis were performed. The TEM average particle diameter obtained was 17.3 nm and the histogram of size distribution as well as a TEM picture of synthesis can be seen in the **Section 2** of the SI. On the other hand, the UV-Vis spectrum for the 17.3 nm AgNPs is also shown in the SI. As expected, the maximum of absorbance was around 400 nm corresponding to the maximum wavelength for AgNP SPR band.

3.2 Preliminary studies

Having commented the adopted strategy to contaminate the soils, the next step consisted of studying possible interferences which could be extracted in the supernatant from the soil altering the spectrophotometric measures. 3 samples of soil (orchard soil was chosen) were contaminated following the above-mentioned procedure with AgNPs, the synthesis blank and water (A, SB and W). After 60 minutes, an aliquot of the supernatant from each sample was measured by UV-Vis. As it can be seen in **Figure 2 a**, for SB and W, samples absorbed at 400 nm (yellow-colored supernatants). Thus, an interfering compound was extracted when water or synthesis blank (at higher rate in this case, further information can be found in **Section 3** of the SI) was added to the soil. On the other hand, for A, the SPRB was altered as the interfering compound (as it will be named hereafter, which can be a group of different chemical species) was also extracted when AgNPs were added to the soil (**Figure 2 a**). Considering the resulting spectral profile, it must be confirmed that the obtained UV-Vis signal is the sum of AgNPs and

the interfering compound absorptions and not the spectrum of a new species formed in the process. The following experiment was performed: successive additions of AgNPs were done on a SB aliquot. The resulting spectra matched in terms of signal profile to the one obtained for the A aliquot. Therefore, both AgNPs and the interfering compound were present in the A supernatant and their absorptions were additive. TEM pictures of this supernatant were taken and dispersed AgNPs were found as **Figure 2 b** shows. The spectra of the performed study and the AgNP SPR of the used synthesis are displayed in **Figure 2 c** and **2 d** respectively.

At this point, having confirmed the presence of an interfering compound in the obtained supernatants, Cap-LC (without IT-SPME) method [20] was selected to quickly analyze the extraction rate of this compound in time (temporal series) for the 4 studied soils and so, to adopt a strategy for avoiding the interferences.

3.3 Cap-LC studies: temporal A, SB and W series

Considering that samples must be manipulated as explained in **Section 2.5**, AgNPs could change after the procedure. Therefore, the variability between processed and unprocessed AgNPs in terms of Cap-LC signal must be studied in the first place. A sample of 1:8 AgNPs was injected before and after the processing. Results are displayed in **Figure 3 a**. Signal did not vary significantly: although the peak profile was slightly different, peak area (the chosen analytical signal of the method) remained virtually unchanged.

The next step consisted of studying the method interference. Following the sample contamination procedure, 3 series (A, SB and W) for each soil consisting of aliquots taken at different times in a 0-80 min range were injected in the system without dilution. For the Cap-LC method, only one chromatographic peak is obtained [20], thus no separation between AgNPs and interfering compound is expected. This fact is

confirmed by the DAD spectra (see **Figure 3 b**) of the obtained peak in series A, SB and W for the 4 soils (spectra matched in the different soil series). Spectral profiles were comparable to the ones obtained in UV-Vis analysis (**Figure 2 a**) and for Series A, DAD spectrum corresponded also to the sum of the involved compounds.

However, as AgNP dispersion in the procedure was the same for each soil, information about the interfering compound extraction could be obtained. **Figure 4** shows the temporal variation of the analytical signal for the 3 series in each soil. Several aspects have to be discussed. In the 4 soils, the highest and lowest signal values were obtained for the A and W respectively as the interfering compound extraction was promoted by the synthesis matrix (and the NP presence in A). The magnitude of this extraction is different depending on the nature of the soil, being in increasing order: urban, orchard, compost and mountain. Here, a relation can be made as the 2 soils where extraction took place in higher proportion (compost and mountain) were the ones containing more SOM (see **Section 3.1**) and, the nature of interfering compound might be organic (presumably, related to HAs). Moreover, if series A are analyzed, 2 groups can be distinguished according of whether a maximum value of the signal was reached (urban and mountain) or not (orchard and compost). In all cases, as the interference is important, a different strategy must be adopted in order to achieve the main goal of quantifying AgNP-soil interaction (that is, in Series A): either separating both compounds (AgNPs and the interfering compound) or eliminating (physically or chemically) one of them.

3.4 IT-SPME Cap-LC

When IT-SPME is coupled to Cap-LC, not only sensitivity is increased (as more sample can be processed), but the particles dispersed in water (as in the present work) are separated by polarity into 2 groups while keeping the signal response to AgNP

concentration (as in the Cap-LC method) [20]. Thus, it can be envisioned that some AgNPs will be separated that if, depending on the IT-SPME-Cap-LC response of the interfering compound.

Firstly, the response of the used synthesis of AgNPs was evaluated in IT-SPME-Cap-LC for testing linearity by injecting samples dilution of it. 30 μ L of sample were injected and a 70 cm long PDMS-TRB35 capillary column was selected (A scheme of the technique is presented in the **Section 4** of the SI). For each injection, two peaks were obtained as expected (the sum of the 2 peaks was taken as the analytical signal). The calibration curve (total peak area vs [AgNPs]) can be seen in the **Section 4** of the SI. Linearity was excellent (R^2 of 0.9998). The working dilution selected for studying AgNP-soil interaction by IT-SPME-Cap-LC was 1:16. Considering the estimated LOD and the chose working dilution, signal variations of more than 96% could be detected.

The next step consisted of doing the sample contamination procedure (see **Section 2.5**) in the 4 soils with AgNPs and the synthesis blank (like in temporal series A and SB), but with one modification: the time of contact was fixed in 60 minutes as the maximum extraction of interfering compound was reached for mountain and urban soils (note: for the 4 soils, the obtained supernatants from the 2 separated contaminations with AgNPs and the synthesis blank will be referred also as samples A and SB respectively).

When samples A of the 4 soils were injected, 2 peaks were obtained (for compost and mountain soils, the 2nd peak was very low). The 1st peak corresponded to a group containing both interfering compound and NPs and the 2nd peak, AgNPs. At this point, the following strategy could be adopted: considering only the 2nd peak for analysis. However, the variety of chemical species presented in each soil matrix could interfere in the distribution of the NPs in the 2 groups inducing error in the estimations

(although, qualitative observations could be made). For this reason, it was decided to chemically destroy (disrupting the absorbance at 400 nm) the AgNPs as the nature of the interfering compound has not been clearly elucidated.

At the same time, studies were made with HAs standards (believed to be responsible of the interferences). The complete study is discussed in **Section 5** of the SI. The HAs response was linear in a wide range of concentrations and the chromatograms presented only one peak with a DAD spectrum that matched the ones obtained for the Cap-LC signals of series SB (see **Figure 3 b**). If the chromatograms and DAD spectra (**Figures 5 a** and **5 b**) of sample A (for instance, orchard soil), AgNPs and HAs were compared, results showed that there is a high probability that the main component of the interfering compound was HAs: the signal of sample A could be seen as the sum of AgNPs and HAs contributions (the same is observed for the DAD spectrum of the 1st peak).

Experimentally, it was found that a high concentration of sodium thiosulfate (1%) quickly disrupted the SPR band absorption of the AgNPs. Even more, sodium thiosulfate did not affect the absorption of the interfering compound in samples SB. Therefore, the following experiment was performed in order to quantify AgNP adsorption in the 4 soils: first, a IT-SPME-Cap-LC kinetic study of the SPR disruption by sodium thiosulfate in AgNPs had to be made for knowing the time at which the NPs are destroyed (or a known % of them); second, samples A (and SB for confirming that the interfering compound signal do not change) for the 4 soils had to be measured before and after adding 1% sodium thiosulfate (at the time estimated in the first step) in order to quantify the amount of AgNPs that are in the supernatants and so, the ones retained in each soil by difference.

For the IT-SPME-Cap-LC kinetic study, the AgNPs were injected directly and in the presence of 1% sodium thiosulfate at different controlled times. **Figure 5c** shows the chromatograms after 40, 45 and 50 minutes of reaction in which the estimated absorption disruption was 86, 89 and 90% (note: after this time, the signal did not decrease significantly). Thus, samples A (and SB) can be measured 50 minutes after being mixed with sodium thiosulfate and if there is a decrease of NP absorption decrease, it will represent 90% of the former signal (a value that can be used for correcting the obtained results). The results of this study are shown in **Figure 6**. Comparing the chromatograms obtained for samples A without and in the presence of sodium thiosulfate (**Figures 6 a** and **6 b** respectively), it can be noticed that signals remained unchanged for compost and mountain soils and that they decreased in the presence of sodium thiosulfate for orchard and urban soils (both presented the 2nd peak in samples A, indicative of the presence of NPs). For orchard soil, signals were higher. As for samples SB, the peak areas without (**Figure 6 c**) and in the presence of sodium thiosulfate (**Figure 6 d**) did not change significantly (less than 3%, satisfactory considering the method RSD of 7%, see **Section 4** of the SI), although peak profiles slightly did.

3.5 Retention Percentage (%) of AgNPs in the different soils

With the performed experiment of using sodium thiosulfate in samples A and SB, quantification of AgNP retention in each soil can be made. By calculating the peak areas variation, considering that it represents 90% of the former signal and comparing to the response obtained for the equivalent dilution of AgNPs, the amount of NPs in the supernatant (samples A) can be obtained and by difference, the AgNPs retained in each soil. **Table 2** shows the results: AgNPs were poorly retained in orchard soil (15.1%), moderately in urban soil (47.6%) and highly in both compost and mountain soils (over

99%). Therefore, in soils where the amount of SOM was higher, so was the NPs retention. In consequence, SOM concentration is the most important factor in NP adsorption as for instance, both compost and mountain soils NPs retention were almost quantitative, although having the smallest and largest soil particles in proportion (see **Table 1**). However, further tests will be made in order to estimate the influence of soil particle size in AgNP retention.

3.6 Retention Percentage (%) of AgNPs in different-sized fractions of a soil

For studying the effect of the soil particle sizes on NP adsorption, urban soil was selected as the AgNP-soil interaction was intermediate and after sieving the soil, 5 different-sized fractions in a similar proportion could be obtained (values in **Table 1**). Thus, urban soil was sieved and the same experiment performed for samples A with sodium thiosulfate was repeated, but this time on each of the 5 size fractions (below 100 μm , 100 to 200 μm , 200 to 300 μm , 300 to 400 μm and coarse fraction). Instead of “samples A”, the name “samples F” will be used. Results for these samples are displayed in **Figure 7**. As it can be seen the signals were higher for the smaller soil size fractions (**Figure 7 a**). For the larger particles (over 200 μm), peak areas were similar.

Retention % of AgNPs was calculated as it is explained in **Section 3.5**. **Table 3** shows the results. For the 3 larger fractions the amount of retained NPs was comparable (the highest for the 300 to 400 μm soil fraction) and higher than the ones obtained for the 2 smaller ones. If total AgNP retention was calculated considering these values and the proportion of each fraction in the soil, a 47% was obtained (similar to the 47.6% obtained in the previous section, estimation error of 1.3%). But overall, despite the fact that larger soil particles retain AgNPs more efficiently probably due to larger interaction surface, the effect of the soil particle size is secondary compared to one caused by higher SOM amounts.

3.7 SEM microanalysis studies

Having worked with the supernatants put in contact with a given soil, but not the soil itself, the final step consisted on estimating the amount of silver in the 4 studied soils by SEM microanalysis. As AgNPs in soils could suffer different reactions [25], it was decided to determine the amount of total silver. SEM microanalysis studies were semi-quantitative and results are displayed in **Table 2** (the estimated soils elementary compositions as well as the SEM pictures can be found in **Section 6** of the SI). In this table, it can be noticed that SEM estimated amounts of silver for compost, mountain, orchard and urban soils correlated well with the calculated retention % of each soil.

4. Conclusions

In the present work, estimations of AgNP adsorption in different soils by measuring the change of SPR band were done. Studies were carried out by mixing an amount of soil with NPs dispersions and after the corresponding procedure involving the addition of sodium thiosulfate, a reagent that selectively destroyed AgNPs among the rest of the extracted absorbing matrix components (presumably HAs), quantification of NPs retention by IT-SPME-Cap-LC-DAD was possible.

Through the signal loss at 400 nm (SPR band maximum), adsorptions % of AgNPs were calculated in compost (>99%), mountain (>99%), orchard (~15%) and urban (~47%) soils. For the latter and after sieving, retentions % of AgNPs were obtained being higher for the larger sized soil fractions. Therefore, AgNP adsorption on a given soil is mainly affected by the amount of SOM and secondary, by properties such as the soil particle size. SEM microanalysis in each soil supported the obtained results.

In summary and considering that each soil retains NPs differently, the proposed methodology made it possible to characterize and quantify the AgNP-soil interaction through a characteristic (and concentration responding in this chromatographic system)

NPs property variation, a step forward in understanding the behavior of AgNPs in complex environmental matrices.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (project CTQ2011-26760) and to The Government of the Generalitat Valenciana (GVA-COMP 2013-155) for the financial support received. R.A. G.-F. expresses his gratitude for a grant to the University of Valencia.

References

- [1] B. Nowack, H. F. Krug and M. Height, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1177-1188.
- [2] T. M. Tolaymat, A. M. El Badawy, A. Genaidy, K. G. Scheckel, T. P. Luxton and M. Suidan, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 999-1006.
- [3] L. H. Ai, C. M. Zeng and Q. M. Wang, *Catal. Commun.* 14 (2011) 68-73.
- [4] X. M. Qian and S. M. Nie, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 912-920.
- [5] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 177-182.
- [6] http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/
- [7] K. J. Lee, P. D. Nallathamby, L. M. Browning, C. J. Osgood and X. H. N. Xu, *ACS Nano* 1 (2007) 133-143.
- [8] A. B. G. Lansdown, *J. Wound Care* 11 (2002) 173-177.
- [9] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, K. Odzak, L. Sigg and R. Behra, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8959-8964.
- [10] J. D. Judy, J. M. Unrine, P. M. Bertsch, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 776-781.
- [11] A. Gogos, K. Knauer, T. D. Bucheli, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9781-9792

- [12] R. Ma, C. Levard, J. D. Judy, J. M. Unrine, M. Durenkamp, B. Martin, B. Jefferson and G. V. Lowry, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 104-112.
- [13] B. Pan and B. Xing, *J. Soil Sci.* 63 (2012) 437-456.
- [14] A. R. VandeVoort and Y. Arai, *Adv. Agron.* 114 (2012) 59-90.
- [15] J. Trzcinski, D. J. Williams and M. Zbik, *Applied Clay Science* 109-110 (2015) 49-54.
- [16] N. Akaighe, R. I. MacCuspie, D. A. Navarro, D. S. Aga, S. Banerjee, M. Sohn and V. K. Sharma, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3895-3901.
- [17] S. J. Yu, Y. G. Yin and J. F. Liu, *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15 (2013) 78-92
- [18] F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectro.* 26 (2011) 1362-1371.
- [19] R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, M. González-Béjar, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, J. Pérez-Prieto, P. Campins-Falcó, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10013-10016.
- [20] R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, V. Parada-Artigues, J. Verdú-Andrés, P. Campins-Falcó, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1485-1493.
- [21] B. Tang, S. Xu, X. Hou, J. Li, L. Sun, W. Xu and X. Wang, *ASC Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 646-653.
- [22] N. L. Pacioni, M. González-Béjar, E. Alarcón, K. L. McGilvray and J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 6298-6299.
- [23] A. J. Frank, N. Cathcart, K. E. Maly, V. Kitaev, *Journal of Chem.* 87 (2010) 1098-1101.
- [24] J. E. Millstone, S. J. Hurst, G. S. Métraux, J. I. Cutler, C. A. Mirkin, *Small* 5 (2009) 646-664.
- [25] J. F. Liu, G. Jian, *Silver Nanoparticles in the Environment*. Springer. 2015.

Figure Captions and Tables

Figure 1. IR spectra for the 4 studied soils obtained by ATR-FTIR

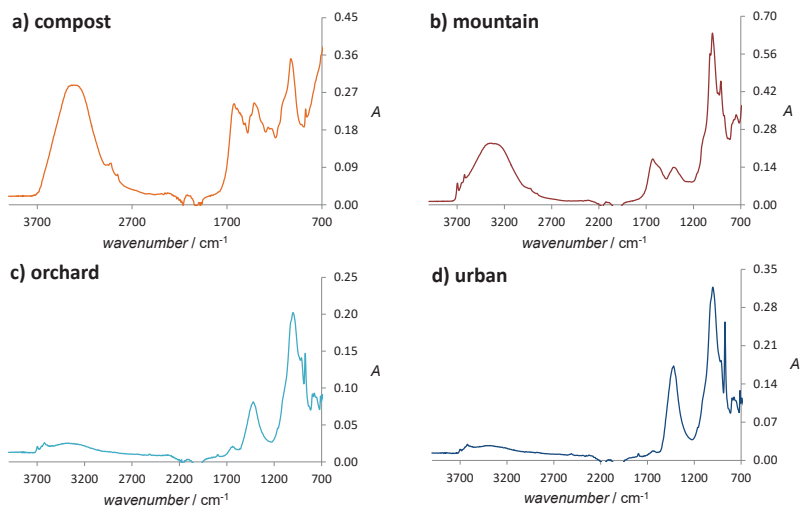


Table 1. Soil size particle composition. Percentages (%) of each fraction for the 4 studied soils.

Fraction	Compost	Mountain	Orchard	Urban
< 100 μm	8.95	3.94	17.80	18.67
100-200 μm	75.26	15.92	22.68	21.59
200-300 μm	14.27	14.02	14.55	19.58
300-400 μm	0.80	16.13	13.36	11.59
> 400 μm^{a}	0.74	49.99	31.61	28.57

^a Coarse fraction

Figure 2. a) UV-Vis spectrum of the supernatant after contaminating soil samples with: (A) AgNPs, (SB) synthesis blank and (W) water. b) TEM picture of supernatant contaminated with AgNPs. c) UV-Vis spectra of the successive additions of AgNPs over the SB supernatant. d) UV-Vis spectrum showing the SPRB of the used AgNP synthesis.

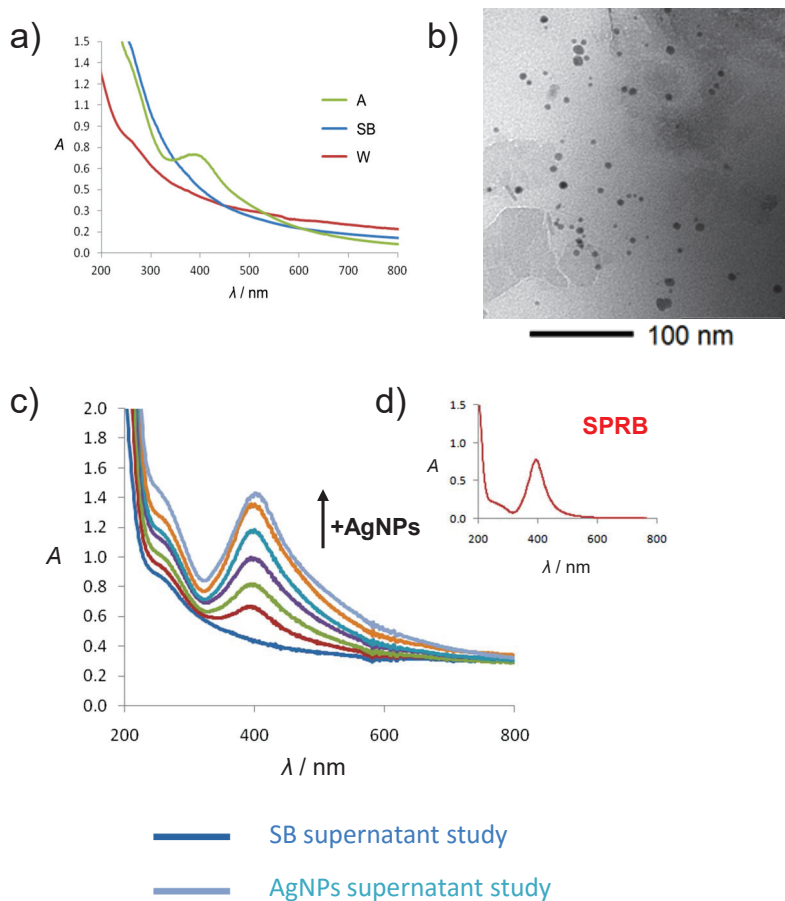


Figure 3. a) Cap-LC chromatograms for samples of 1:8 AgNPs: unprocessed and processed (samples U and P respectively). b) DAD spectra for the peaks obtained in the 3 series (A, SB and W) for the 4 soils (in this case, measured in orchard soil samples chromatograms).

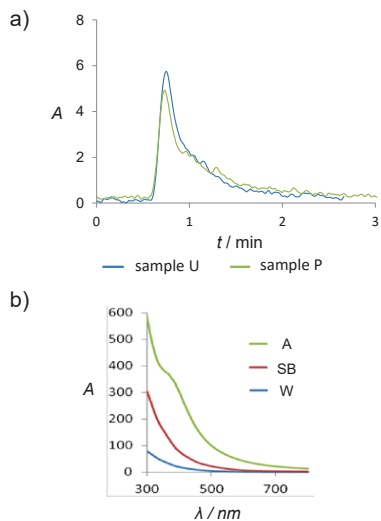


Figure 4. Cap-LC signals variation in time (0-80 min range) for the 3 series (A, SB and W) in each of the 4 soils (compost, mountain, orchard and urban).

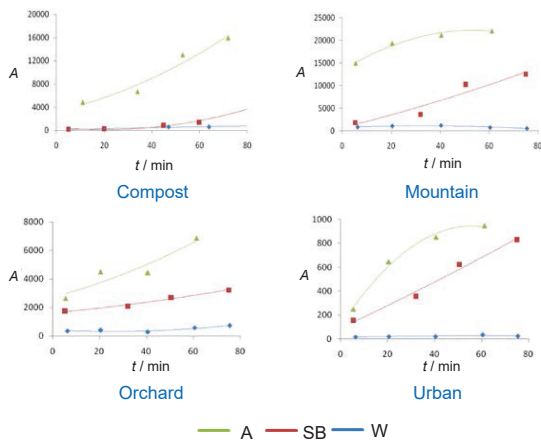


Figure 5. a) Chromatograms for: (1) 1:16 AgNPs, (2) 1:16 Sample A of the orchard soil and (3) a HAs standard (10 ppm). b) DAD spectra for: (1A) 1st and (1B) 2nd peaks of 1:16 AgNPs, (2A) 1st and (2B) 2nd peaks of 1:16 Sample A and (3) 1st peak of the HAs

standard. c) Chromatograms obtained for AgNPs: (A) without, and in the presence of 1% sodium thiosulfate after (B) 40, (c) 45 and (D) 50 minutes of reaction.

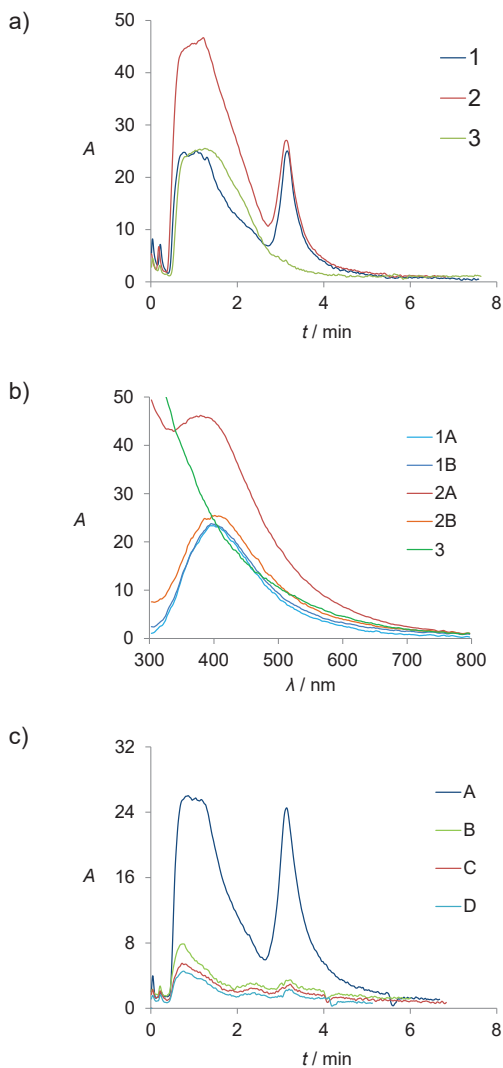


Figure 6. Chromatograms for (1) compost, (2) mountain, (3) orchard and (4) urban soils corresponding to: for samples A, injections a) without and b) in the presence of 1% sodium thiosulfate; for samples SB, injections c) without and d) in the presence of 1%

sodium thiosulfate (note: exposition of the samples to sodium thiosulfate of 50 min, 1:16 sample dilutions).

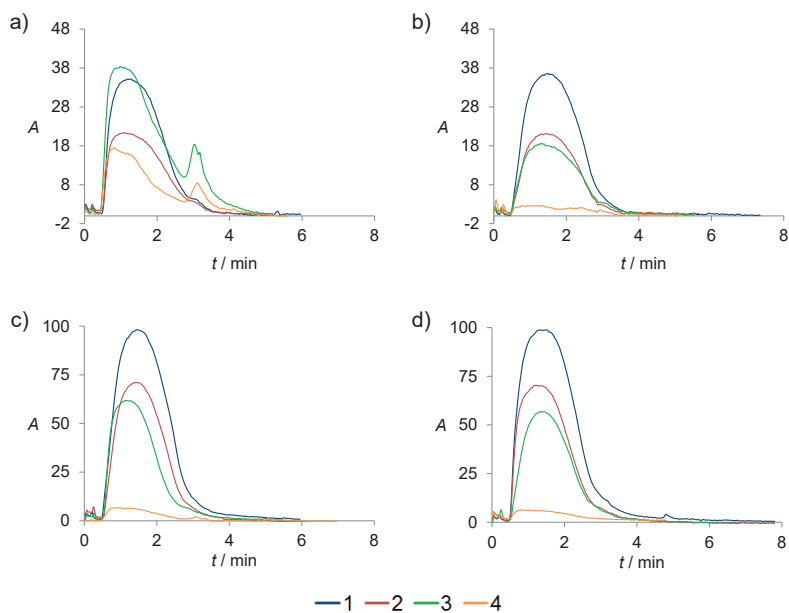


Table 2. Retention % of AgNPs quantified by IT-SPME-Cap-LC-DAD in the different spiked soils and relative % of silver detected by SEM microanalysis.

Soil	AgNPs (%)	Ag (%)
Compost	>99	0.69
Mountain	>99	0.66
Orchard	15.1	0.35
Urban	47.6	0.44

Figure 7. Chromatograms obtained from measuring samples F without and in presence of 1% sodium thiosulfate for different fractions of urban soil: (1) coarse fraction, (2) 300 to 400 μm , (3) 200 to 300 μm , (4) 100 to 200 μm and (5) below 100 μm (note: exposition of the samples to sodium thiosulfate of 50 min, 1:16 sample dilutions).

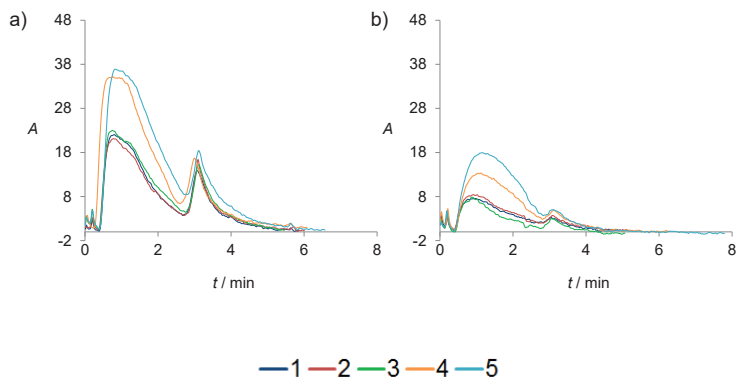


Table 3. Retention % of AgNPs in urban soil fractions quantified by IT-SPME-Cap-LC-DAD.

Fraction	Fraction (%)	AgNPs (%)
< 100 μm	18.67	38.9
100-200 μm	21.59	40.8
200-300 μm	19.58	52.9
300-400 μm	11.59	54.7
> 400 μm	28.57	49.8
total	100	47.0

Anexo 9.

Supporting Information

for

**Study of the adsorption interaction between AgNPs and
different soil matrices by in tube solid-phase microextraction
coupled to capillary liquid chromatography.**

Study of the adsorption interaction between AgNPs and different soil matrices by In Tube Solid-Phase Microextraction coupled to Capillary Liquid Chromatography

Rodrigo A. González-Fuenzalida, Yolanda Moliner-Martínez, Irene Escribano-López, Pilar Campins-Falcó*

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, C/ Doctor Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

*Corresponding author: E-mail: pilar.campins@uv.es; Fax:(+34)963543447

Acknowledgements. The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (projects: CTQ2011-26760, CTQ-2014-53916-P) and Generalitat Valenciana (PROMETEO program 2012/045). R.A. G.-F. expresses his gratitude for a grant to the University of Valencia.

Section 1. Soils characterization	2
Section 2. Characterization of the AgNPs	3
Section 3. Interfering compound extraction	3
Section 4. IT-SPME-Cap-LC scheme and calibration	4
Section 5. HAS studies by IT-SPME-Cap-LC	5
Section 6. SEM microanalysis	6
Section 7. References	9

Section 1. Characterization of the soils

Figure S1 shows the distribution of particle size for each soil as well as Eclipse Microscope pictures for one or them (in this case, orchard soil) after being sieved.

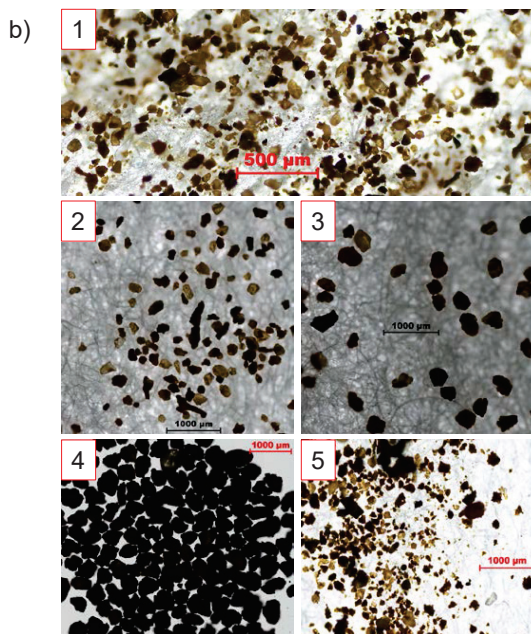
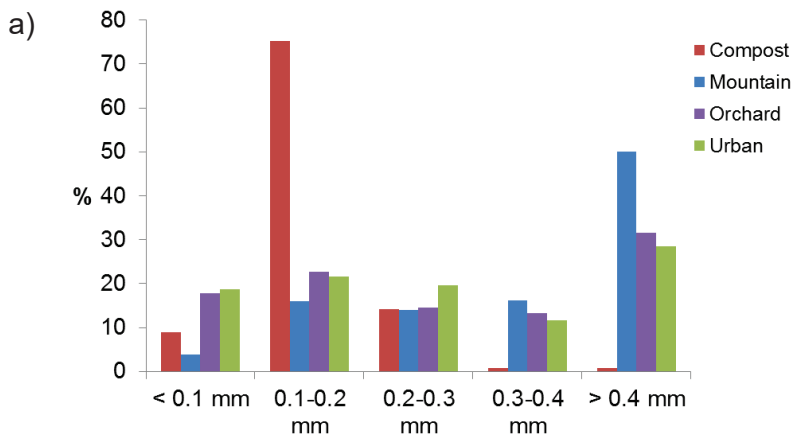


Figure S1. a) Chart showing distribution of particle size in the 4 studied soils and b) Eclipse microscope pictures for each fraction of the orchard soil after being sieved: (1) below 100 μm , (2) 100-200 μm , (3) 200-300 μm , (4) 300-400 μm and (5) above 400 μm .

Section 2. Characterization of the AgNPs

Figure S2 shows both TEM histogram and UV-Vis spectrum (1:8 measured dilution) for 17.3 nm AgNPs, the synthesis used in all the studies of the present work.

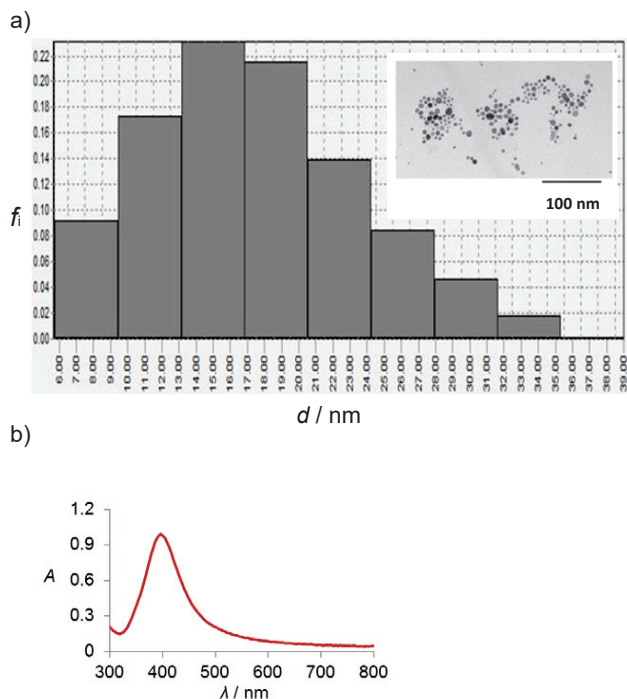


Figure S2. a) TEM histogram of 17.3 nm AgNPs showing their size distribution and TEM picture (up-right). b) UV-Vis spectrum of 1:8 17.3 nm AgNPs.

Section 3. Interfering compound extraction.

Considering that the major reagent involved in AgNP syntheses is sodium citrate, a quantity of soil was mixed with a citrate solution. After 1 hour, an aliquot of the supernatant was measured by UV-Vis spectrophotometry. Compared to the spectrum obtained when the soil was mixed with the synthesis blank, it can be stated that citrate promotes the extraction of the interfering compound. The results are displayed in **Figure S3**.

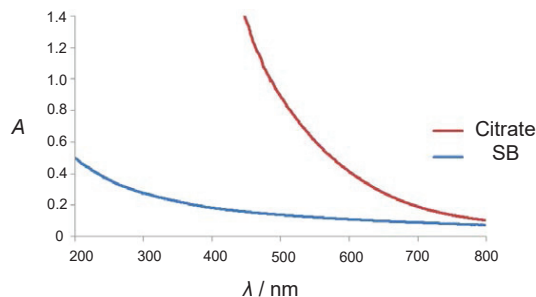


Figure S3. a) UV-Vis spectra of the supernatants of: (SB) soil-synthesis blank and (Citrate) soil-sodium citrate solution mixtures.

Section 4. IT-SPME-Cap-LC scheme and calibration.

The technique device is displayed in **Figure S4a**. The IT-SPME was achieved by coupling a PDMS capillary column to the injection valve. The different system parts are: the pump working at isocratic mode, the PDMS-TRB35 capillary column coupled to the injection valve of the system (picture on the right in **Figure S4a**), the Jupiter C18 analytical column and finally the DAD detector. The mobile phase (MPH) was an aqueous SDS solution.

On the other hand, **Figure S4b** shows the calibration curve (total peak area vs [AgNPs]) obtained for 17.3 nm AgNPs. Sample dilutions of 1:8, 1:16 and 1:32 corresponding to 0.43, 0.22 and 0.11 nM respectively were injected. Concentrations were calculated using an adapted equation which relates [AgNPs] and d_{AgNPs} [1]:

$$d_{AgNPs} = \left(\frac{[Ag^+] \cdot d_{Ag}^3}{[AgNPs]} \right)^{1/3}$$

The diameter of silver (d_{Ag}) used was 0.289 nm and [Ag⁺] represents the silver concentration in the sample (as AgNO₃). This equation was adapted from a formula for estimating gold nanoparticles [2].

The linearity was excellent (R^2 of 0.9998) and the slope (value of 14145 nM⁻¹) was comparable to the one obtained in [1] as well as the RSD% value (7%). The limit of detection (LOD) and $s_{y/x}$ were 0.009 nM and 45.5 respectively.

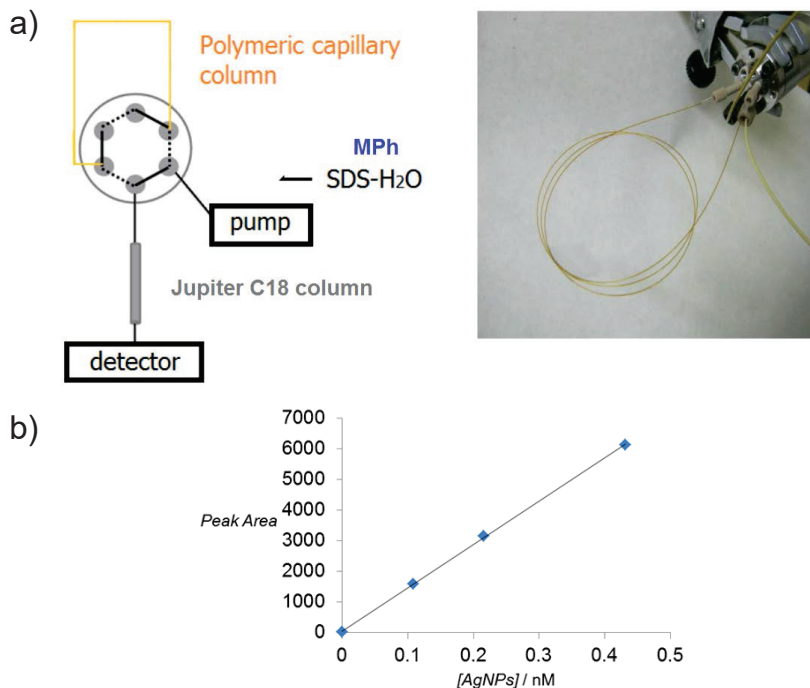


Figure S4. a) Scheme of the IT-SPME-Cap-LC-DAD technique showing its different components: pump (aqueous SDS mobile phase (MPh)), capillary column coupled to the injection valve (picture on the right), analytical column and detector. b) IT-SPME-Cap-LC calibration curve using the 17.3 nm AgNPs as standard.

Section 5. Studies of HAs by IT-SPME-Cap-LC

Humic Acids (HAs) were tested by this method in the concentration range from 0 to 500 ppm (solutions were yellow). A linear response was obtained (R^2 of 0.99997). Only one chromatographic peak was observed and the DAD spectrum matched the one obtained for the supernatant when soils were spiked with the synthesis blank (SB). **Figure S5** shows the calibration curve, chromatograms for 6 levels of concentration and the DAD spectrum for one of it.

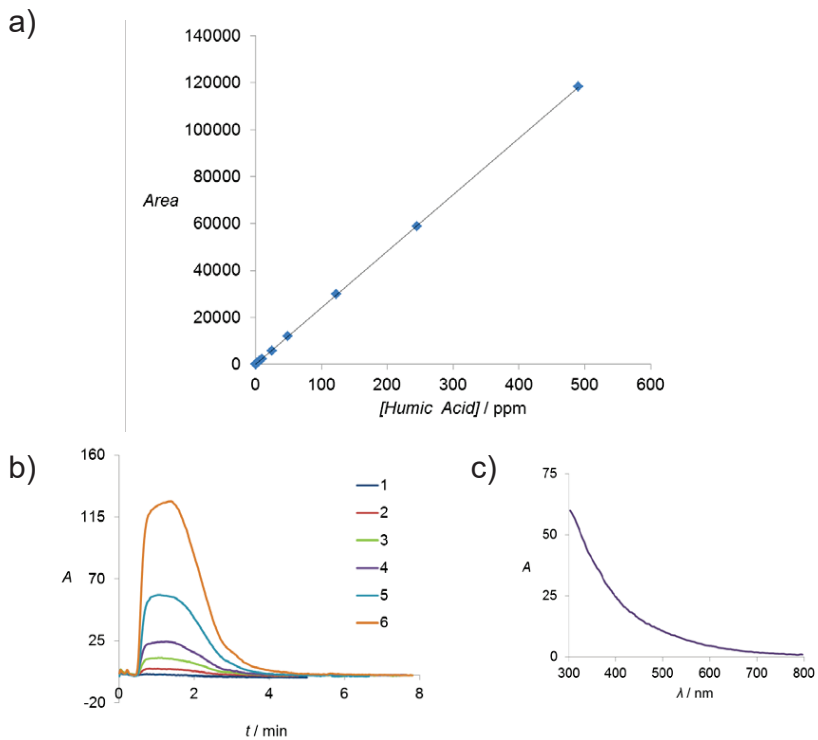


Figure S5. a) IT-SPME-Cap-LC Calibration curve for HAs from 0 to 500 ppm. b) Chromatograms obtained for [HAs] standards of: (1) 0.5, (2) 2, (3) 5, (4) 10, (5) 25 and (6) 50 ppm. c) DAD spectrum for (4).

Section 6. SEM microanalysis

Figure S6 shows the pictures taken for the compost, mountain, orchard and urban soils. In **Tables S1, S2, S3** and **S4**, the SEM estimated elementary composition is displayed (silver values are highlighted).

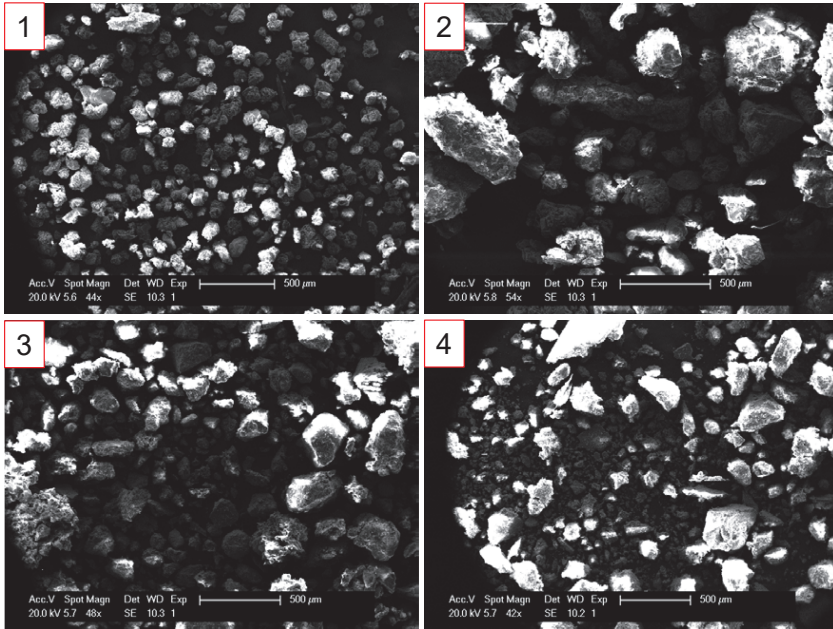


Figure S6 a) SEM pictures of the 4 studied soils: (1) compost, (2) mountain, (3) orchard and (4) urban.

Tables S1, S2, S3 and S4. SEM microanalysis:

S1. Compost

Element	mass (%)
O K	67.83
Mg K	1.30
Al K	2.69
Si K	9.83
Ag L	0.69
K K	2.28
Ca K	12.72
Fe K	2.66
Total	100

S2. Mountain

Element	mass (%)
O K	50.64
Mg K	0.37
Al K	14.98
Si K	26.76
Ag L	0.66
K K	2.24
Ca K	1.84
Fe K	2.51
Total	100

S3. Orchard

Element	mass (%)
O K	57.82
Mg K	0.91
Al K	6.86
Si K	20.14
Ag L	0.35
K K	2.69
Ca K	7.28
Fe K	3.96
Total	100

S4. Urban

Element	mass (%)
O K	59.13
Mg K	0.99
Al K	4.82
Si K	16.42
Ag L	0.44
K K	1.95
Ca K	13.25
Fe K	3.01
Total	100

Section 7. References

- [1] R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, V. Parada-Artigues, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1485-1493.
- [2] N. L. Pacioni, M. González-Béjar, E. Alarcón, K. L. McGilvray, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 6298-6299.

