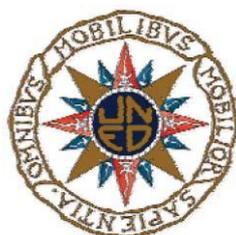


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA FACULTAD DE
CIENCIAS**

Departamento de Ciencias Analíticas



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y
PRECONCENTRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE 1-HIDROXIPIRENO
EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

MONTSERRAT SERRANO VALENCIANO

Licenciada en Ciencias Químicas

MADRID, 2016

**DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y
PRECONCENTRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE 1-HIDROXIPIRENO
EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL

MONTSERRAT SERRANO VALENCIANO

Licenciada en Ciencias Químicas

Directora de la Tesis: D^a Rosa M^a Garcinuño Martínez

Codirectora de la Tesis: D^a Alejandrina Gallego Picó

MADRID, 2016

ROSA M^a GARCINUÑO MARTÍNEZ Profesor Contratado Doctor, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

ALEJANDRINA GALLEGO PICÓ Profesor Contratado Doctor, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo aquí presentado bajo el título: **“Desarrollo de nuevos métodos de aislamiento y preconcentración para la determinación de 1-hidroxipireno en muestras biológicas”**, que constituye la memoria que presenta **Dña. Montserrat Serrano Valenciano** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Analíticas de la Facultad de Ciencias de la UNED. Asimismo, manifiestan que el trabajo descrito en la presente memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que autorizan su presentación para que sea defendido como **Tesis Doctoral**.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Madrid, a 24 de Noviembre de 2015.

Fdo.: Rosa M^a Garcinuño Martínez

Fdo.: Alejandrina Gallego Picó

C/ Senda del Rey n° 9
28040, Madrid

Tel: 00 34 91 398 73 96
Fax: 00 34 91 398 83 79

<http://www.uned.es/dpto-ciencias-analiticas>

AGRADECIMIENTOS

Estas primeras páginas ponen fin a un proyecto que comenzó casi por casualidad hace mucho, muchísimo tiempo.

De todos estos años me quedo con el recuerdo y agradecimiento hacia todas aquellas personas que en uno u otro grado han aportado su granito y granazo de arena para hacerlo posible.

En primer lugar a mis profesores, especialmente a Alejandrina por siempre pensar, aunque yo lo dudase, que lo podía hacer. A Rosa, Pilar y Senén, por estar pendiente de que nunca tirase la toalla y por acogerme todos estos años.

A mis compañeros de batalla que tanto y con tanta paciencia me han enseñado, a Gema, Juan Carlos, Edu, David, Monica, Aitor, Marco y las diferentes Anas.

A los que lo hicieron materialmente posible, a Olga Montejo y Fernando Trenado, o más en concreto a sus hijos (Pablo Ayuso Montejo, Fernando Trenado López y Álvaro Trenado López), por cederme sus muestras de orina. A Juan Carlos Bravo por cederme también las muestras de leche materna.

A los que lo hicieron espiritualmente posible, Miguel, mi familia, mis amigos, sobre todo a mi padre, porque esta es mi forma de decirte lo mucho que te echo de menos. Y a mi no menos familia Boro y Seda, que tantas horas han pasado en mi regazo durmiendo mientras yo ordenaba, corregía y escribía todos estos años de trabajo.

De modo muy especial a todos os guardo y os guardaré siempre en mi corazón por la ayuda prestada, no habría sido posible sin vosotros.

Parce que moi je rêve moi je ne le suis pas

Índice



ÍNDICE

I. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	1
II. INTRODUCCIÓN.....	9
<i>CAPÍTULO 1. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....</i>	<i>11</i>
1.1. Antecedentes históricos.....	14
1.2. Origen y fuentes de los HAPs. Usos industriales.....	16
1.3. Principales vías de exposición.....	19
1.3.1. Vía inhalatoria.....	19
1.3.2. Vía digestiva.....	19
1.3.3. Vía dérmica.....	19
1.4. Ruta metabólica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	20
1.4.1. Metabolismodel pireno.....	23
1.5.Aspectos toxicológicos.....	25
1.6. Propiedades físico-químicas.....	29
1.6.1. Fenómenos de fluorescencia.....	33
<i>CAPÍTULO 2. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y SUS BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN.....</i>	<i>37</i>
2.1. Importancia de los estudios de biovigilancia.....	37
2.1.1. Matrices biológicas.....	39

2.1.2. Elección del biomarcador.....	40
2.1.3. Bioindicadores de dosis biológica.....	41
2.1.4. Metodología analítica.....	42
2.1.5. Valores de referencia.....	44
2.1.6. Programas de HBM.....	45
2.1.7. Valores de referencia para los HAPs.....	49
2.2. El 1-hidroxipireno como principal biomarcador.....	56
III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	61
<i>CAPÍTULO 3. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR.....</i>	<i>63</i>
3.1. Conceptos generales.....	63
3.2. Síntesis.....	64
3.2.1. Síntesis covalente.....	69
3.2.2. Síntesis semi-covalente.....	70
3.2.3. Síntesis no covalente.....	71
3.3. Optimización de la síntesis.....	71
3.4. Métodos de polimerización.....	76
3.4.1. Polimerización en bloque.....	76
3.4.2. Polimerización por precipitación.....	77
3.4.3. Polimerización en suspensión.....	78

3.4.4. Polimerización en dos etapas.....	78
3.4.5. Técnicas de injerto.....	78
3.5. Principales aplicaciones de los MIP.....	79
3.5.1. Preparación de la muestra.....	79
3.5.2. Fase selectiva en técnicas de separación.....	84
3.5.3. Sensores.....	86
3.5.4. Aplicaciones en HAPs y sus metabolitos.....	86
<i>CAPÍTULO 4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y SUS BIOMARCADORES.....</i>	<i>89</i>
4.1. Preparación de muestras.....	92
4.2. Análisis instrumental.....	99
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	109
<i>CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	<i>111</i>
5.1. Materiales.....	111
5.1.1. Reactivos.....	111
5.1.2. Disoluciones de trabajo.....	111
5.1.3. Equipos.....	112
5.1.4. Otro material.....	113
5.2. Métodos.....	113

5.2.1. Determinación analítica del 1OHPyr.....	113
5.2.2. Procedimiento cromatográfico.....	114
5.2.3. Optimización del método cromatográfico (HPLC-FD).....	115
<i>CAPÍTULO 6. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR</i>	<i>121</i>
6.1. Introducción.....	121
6.2. Desarrollo de la metodología.....	121
6.2.1. Síntesis de polímeros de impresión molecular en bloque (MIP _{bloque}).....	121
6.2.2. Síntesis de polímeros de impresión molecular por precipitación (MIP _{precip}).....	123
6.2.3. Caracterización morfológica. SEM.....	126
6.2.4. Isotermas de adsorción.....	126
6.3. Discusión de los resultados.....	127
6.3.1. Síntesis de polímeros.....	127
6.3.2. Caracterización morfológica. SEM.....	129
6.3.3. Isotermas de adsorción.....	133
6.4. Conclusiones.....	144
<i>CAPÍTULO 7. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA EL 1-HIDROXIPIRENO.....</i>	<i>147</i>
7.1. Introducción.....	147

7.2. Desarrollo de la metodología.....	151
7.2.1. Procedimiento MISPE.....	151
7.2.2. SPE con C-18.....	153
7.3. Discusión de los resultados.....	154
7.3.1. Optimización de las etapas del proceso MISPE.....	154
7.3.2.1. Proceso MISPE. Polímeros sintetizados por precipitación.....	154
7.3.2.2. Proceso MISPE. Polímeros sintetizados en bloque.....	161
7.3.2. Estudios de selectividad.....	166
7.3.3. Comparación de resultados con C-18.....	171
7.4. Conclusiones.....	172

CAPÍTULO 8. PROCEDIMIENTO FIA PARA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE 1-HIDROXIPIRENO CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR.....175

8.1. Introducción.....	175
8.2. Desarrollo de la metodología.....	182
8.2.1. Detección fluorimétrica.....	182
8.2.2. Configuración del sistema FIA.....	183
8.2.3. Procedimiento FIA.....	184
8.2.4. Proceso FIA en muestras de orina.....	185
8.3. Discusión de los resultados.....	185

8.3.1. Optimización de método fluorimétrico.....	185
8.3.2. Optimización de las etapas del proceso FIA.....	186
8.3.3. Aplicación del proceso FIA en muestras de orina. Validación del método.....	190
8.4. Conclusiones.....	193
<i>CAPÍTULO 9. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD) PARA LA DETERMINACIÓN DEL 1-HIDROXIPIRENO EN MUESTRAS DE LECHE.....</i>	<i>197</i>
9.1. Introducción.....	197
9.2. Desarrollo de la metodología.....	202
9.2.1. Procedimiento cromatográfico.....	202
9.2.2. Procedimiento MSPD convencional en muestras de leche materna.....	203
9.2.3. Procedimiento MSPD combinado con MISPE en muestras de leche materna.....	204
9.2.4. Procedimiento MIP-MSPD en muestras de leche materna.....	205
9.3. Discusión de los resultados.....	206
9.3.1. Optimización de las etapas del proceso MSPD convencional para leche materna.....	206
9.3.2. Optimización de las etapas del proceso MSPD combinado con MISPE en leche materna.....	212

9.3.3. Optimización de las etapas del proceso MIP-MSPD en leche materna.....	213
9.3.4. Validación del procedimiento MIP-MSPD en muestras de leche materna.....	216
9.4. Conclusiones.....	218
V. CONCLUSIONES.....	221
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	227
VII. ANEXOS.....	283
-Congresos.....	285
-Publicaciones.....	291

ABREVIATURAS

1OHPyr	1-Hidroxipireno
1OHPhe	1-Hidroxifenantreno
2OHPhe	2-Hidroxifenantreno
3OHB[a]Pyr	3-Hidroxibenzo[a]pireno
3OHPhe	3-Hidroxifenantreno
4OHPhe	4-Hidroxifenantreno
9OHPhe	9-Hidroxifenantreno
AA	Absorción atómica
ACN	Acetonitrilo
AIBN	2-Azo(bis)isobutironitrilo
AMAP	Programa de Evaluación y monitoreo del Ártico (<i>Arctic Monitoring and Assessment Programme</i>)
ATSDR	Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (<i>Agency of Toxic Substances and Disease Registry</i>)
B[a]A	Benzo[a]antraceno
B[a]Pyr	Benzo[a]pireno
CAS	(<i>Chemical Abstract Service</i>)
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)

CE	Comunidad Europea
CHMS	Encuestas sobre Medidas de Salud Canadienses (<i>Canadian Health Measures Survey</i>)
COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
CGP	Partículas de vidrio de poro controlado (<i>glass controled pore</i>)
DAD	Detector de diodos en serie (<i>Diode Array Detector</i>)
DCM	Diclorometano
DLCME	Microextracción líquida-líquida dispersiva (<i>Dispersive Micro-solid phase with Ionic Liquid</i>)
EC	Electrocromatografía capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EI	Detector de impacto electrónico con cuadrupolo (<i>Electron Impact</i>)
EPA	Agencia de Protección Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ESFA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European FoodSafety Authority</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FD	Detector de fluorescencia
FIA	Análisis por inyección en flujo (<i>Flow Injection Analysis</i>)
FID	Detector de ionización de llama

GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GerES	Encuesta de Medio Ambiente Alemana (<i>German Environmental Survey</i>)
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
HBM	Biomonitorización humana (<i>Human Biomonitoring</i>)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (<i>Agency of Research on Cancer</i>)
I-MS	Espectrometría de masas con trampa de iones
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo
IPC	Espectrometría de emisión con fuente de plasma (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)
IR	Espectroscopia infrarroja
IUPAC	Agencia Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
JECFA	Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>)
K_{oc}	Coefficiente de reparto carbono orgánico-agua
LC	Cromatografía de líquidos (<i>Liquid Chromatography</i>)
LLE	Extracción líquido-líquido (<i>Liquid Liquid Extraction</i>)

LOD	Límite de detección (<i>Limit of detection</i>)
Log K_{ow}	Coefficiente de reparto octanol-agua
LOQ	Límite de cuantificación (<i>Limit of quantification</i>)
LPME	Microextracción en fase líquida (<i>Micro Liquid Phase Extracción</i>)
MAA	Ácido metacrílico
MAE	Extracción asistida por microondas (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MeOH	Metanol
MIP	Polímero de impresión molecular (<i>Molecularly Imprinted</i>)
MISPE	Extracción en fase sólida basada en polímeros de impresión molecular (<i>Molecularly-imprinted solid phase extraction</i>)
MS	Espectrómetro de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersión</i>)
NIOSH	Instituto Nacional para la Seguridad y Salud. Ocupacional (<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>)
NCI	Ionización química negativa (<i>Negative Chemical Ionization</i>)
NHANES	Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>)
NIP	Polímero no impreso
OHPhe	Hidroxifenantreno
PCB	Bifenilos policlorados (<i>Polychlorinated biphenyls</i>)

PCDD	Dibenzodioxinas policloradas (<i>Polychlorodibenzo-p-dioxins</i>)
PCDF	Dibenzofuranos policlorados (<i>Polychlorodibenzofurannes</i>)
PCI	Ionización química positiva (<i>Positive Chemical Ionization</i>)
PDMS	Polidimetilsilosano
PLE	Extracción con líquido presurizado
PRTR	Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (<i>Pollutant Release and Transfer Register</i>)
PTFE	Politetrafluoroetileno
Pyr	Pireno
RMN	Resonancia magnética nuclear (<i>Resonance Magnetic Nuclear</i>)
RSD	Desviación estándar relativa (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SBME	Microextracción con barra agitadora (<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>)
SDME	Microextracción en gota suspendida
SEM	Microscopio electrónico de barrido (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid-phase extractión</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida
TOF/MS	Espectrometría de masas "tiempo de vuelo"
USE	Extracción asistida por ultrasonidos

UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visible
WHO	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación

TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.1. *Los 16 HAPs prioritarios*

Tabla 1.2. *Propiedades físico-químicas de HAPs*

Tabla 2.1. *Contenido de Benzo[a]pireno en alimentos*

Tabla 2.2. *Principales biomarcadores de HAPs*

Tabla 4.1. *Métodos seleccionados de la US EPA para la determinación de HAPs en el medio ambiente*

Tabla 4.2. *Resumen bibliográfico del análisis de HAPs y sus metabolitos*

Tabla 6.1. *Datos experimentales MIP_{bloque} y NIP_{bloque} para el 1OHPyr*

Tabla 6.2. *Datos experimentales MIP_{precip} y NIP_{precip} para el 1OHPyr*

Tabla 6.3. *Parámetros obtenidos por ajuste no lineal de las isothermas de Langmuir y Freundlich para MIP_{bloque} y NIP_{bloque}*

Tabla 6.4. *Parámetros obtenidos por ajuste no lineal de las isothermas de Langmuir y Freundlich para MIP_{precip} y NIP_{precip}*

Tabla 7.1. *Condiciones $MISPE_{precip}$ optimizadas para el 1OHPyr*

Tabla 7.2. *Condiciones $MISPE_{bloque}$ optimizadas para el 1OHPyr*

Tabla 7.3. *Reproducibilidad y repetibilidad utilizando MIP_{precip}*

Tabla 7.4. *Resultados con el NIP*

Tabla 7.5. *Reproducibilidad y repetibilidad del MIP_{bloque}*

Tabla 7.6. *Resultados con el polímeros no impreso*

Tabla 7.7. *Gradiente de concentraciones en la separación de los isómeros del Phe*

Tabla 8.1. *Estudio de reproducibilidad y repetibilidad del método FIA-MIP*

Tabla 9.1. *Valores de recuperación intra e inter días para MIP-MSPD*

FIGURAS

Figura 1.1. *Oxidación enzimática del B[a]Pyr*

Figura 1.2. *Ruta metabólica del B[a]Pyr*

Figura 1.3. *Metabolismo del pireno*

Figura 1.4. *Diagrama de Jablosnki*

Figura 2.1. *Esquema de la biovigilancia y su importancia en la Química Analítica*

Figura 2.2. *Estructura del 1-hidroxipireno*

Figura 3.1. *Esquema del proceso de formación del polímero de impresión molecular*

Figura 3.2. *Principales monómeros funcionales empleados para la formación del MIP*

Figura 3.3. *Entrecruzantes empleados en la síntesis de MIP*

Figura 4.1. *Error relativo en las diferentes etapas del procedimiento analítico*

Figura 5.1. *Cromatograma del 1-hidroxipireno*

Figura 5.2. *Recta de calibrado del 1OHPyr para muestras sintéticas*

Figura 5.3. Recta de calibrado del 1OHPyr para muestras de orina

Figura 6.1. Agitación del MIP_{precip}

Figura 6.2. Experimento en batch para la caracterización de los MIP

Figura 6.3. Imagen SEM tomada a 5 micras. Polímero sintetizado por precipitación

Figura 6.4. Imagen SEM tomada a 10 micras. Polímero sintetizado por precipitación

Figura 6.5. Imagen SEM tomada a 30 micras. Polímero sintetizado por precipitación

Figura 6.6. Imagen SEM tomada a 10 micras Polímero sintetizado en bloque.

Figura 6.7. Representación gráfica de los datos experimentales MIP_{bloque} y NIP_{bloque} para el 1OHPyr

Figura 6.8. Representación gráfica de los datos experimentales MIP_{precip} y NIP_{precip} para el 1OHPyr

Figura 6.9. Representación de la ecuación de Scatchard para el MIP_{bloque}

Figura 6.10. Representación de la ecuación de Scatchard para el MIP_{precip}

Figura 7.1. Etapas de un proceso SPE

Figura 7.2. Fotografía tomada de los polímeros sintetizados por precipitación. A NIP_{precip} y MIP_{precip}

Figura 7.3. Optimización del disolvente de lavado. El cartucho que contiene el polímero impreso es denominado con la letra M, mientras que el polímero no impreso es denominado como N. Los números a continuación identifican los disolventes de lavado empleados, siendo estos: 1, ACN:MeOH (50:20,v/v); 2, ACN:MeOH (80:20,v/v); 3, H₂O; 4, ACN; 5, ACN:H₂O (95:5,v/v)

Figura 7.4. Optimización del disolvente de elución

Figura 7.5. Cromatogramas de una muestra de orina (A) antes y después del proceso MISPE (B)

Figura 7.6. Optimización del disolvente de lavado. M polímero impreso, N polímero no impreso. Los números identifican los disolventes de lavado, 1 ACN:MeOH (50:20,v/v), 2 ACN:MeOH (80:20,v/v), 3 agua, 4 ACN y 5 ACN:H₂O (95:5,v/v).

Figura 7.7. Optimización del disolvente de elución

Figura 7.8. Isómeros del derivado hidroxilado del fenantreno

Figura 7.9. Cromatograma de los isómeros del Phe

Figura 7.10. Selectividad de los isómeros del OHPHe con el 1OHPyr. La fracción no retenida se representa en color azul, la fracción de limpieza en color rojo y la eluida en color verde

Figura 7.11. Cromatograma conjunto de los 5 analitos en muestras de orina tras procedimiento MISPE

Figura 8.1. Clasificación de los sistemas en flujo (IUPAC). CFA: flujo continuo multisegmentado. FIA: análisis por inyección en flujo. LC: cromatografía líquida. MSFA: análisis en flujo monosegmentado. SIA: análisis por inyección secuencial

Figura 8.2. Sistema de análisis por inyección en flujo

Figura 8.3. Unidad de propulsión. Cabezal de bomba peristáltica

Figura 8.4. Válvula de 6 vías. La válvula en posición A representa la posición de carga, mientras que la válvula en la posición B representa la posición de inyección

Figura 8.5. Esquema del montaje del sistema FIA para la determinación del 1OHPyr. Las disoluciones empleadas fueron A= ACN, B: mezcla de ACN:H₂O en proporción (95:5,v:v) y C: mezcla de MeOH:DCM en proporción (85:15,v:v)

Figura 8.6. Esquema del montaje FIA. Célula de flujo (Quartz Suprasil[®]) 150 µL empleada en el montaje FIA

Figura 8.7. *Detalle de la microcolumna empaquetada con el MIP_{bloque}*

Figura 8.8. *Perfil de respuesta del sistema FIA para la disolución estándar de 1OHPyr (100 $\mu\text{g/L}$) empleando una microcolumna conteniendo el NIP (1) y microcolumna conteniendo el MIP (2)*

Figura 8.9. *Perfiles de respuesta del sistema FIA para el 1OHPyr (400 $\mu\text{g/L}$). Señal para muestras de orina sin columna (1), y empleando la microcolumna conteniendo el MIP: etapa de lavado (2) y etapa de elución (3)*

Figura 9.1. *Esquema del procedimiento MSPD*

Figura 9.2. *Recuperación del analito empleando diversos eluyentes*

Figura 9.3. *Cromatograma de 2 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr en muestras de leche tras la MSPD*

Figura 9.4. *Cromatograma de 2 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr en muestras de leche tras la MIP-MSPD*

Figura 9.5. *Recta de calibrado del 1OHPyr*

I. Objetivos y justificación del trabajo



I. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Las elevadas concentraciones de sustancias a las que el ser humano está expuesto y que afectan negativamente a su salud, mantienen una estrecha relación en la mayoría de los casos con las prácticas productivas modernas y el desarrollo industrial.

De entre el vasto número de xenobióticos que pueden considerarse como contaminantes emergentes, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) ocupan un importante apartado debido a su persistencia, diversidad y toxicidad, ya que pueden permanecer en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas.

Bajo la denominación de hidrocarburos aromáticos policíclicos o HAPs, se engloba un grupo de compuestos caracterizados por la unión de varios anillos bencénicos. Más de 100 compuestos pertenecientes a esta gran familia son considerados peligrosos contaminantes por sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, siendo además posibles disruptores endocrinos. Aunque los HAPs han estado presentes como contaminantes naturales desde los inicios de la vida del hombre, es cierto que el desarrollo industrial ha provocado un gran aumento de sus concentraciones. La exposición a los HAPs se produce, sobre todo, por la inhalación de dichos compuestos que se encuentran presentes en el aire (debido a la quema de carbón y madera, emisiones de automóviles, plantas generadoras de energía, quema de desperdicios, humo de tabaco...) y la ingesta de alimentos contaminados o alimentos que han sido preparados utilizando determinadas prácticas culinarias como el ahumado, el tostado o cocinados en barbacoa. También puede ser posible su absorción por vía dérmica, principalmente en ambientes laborales.

El riesgo asociado a los HAPs y su ubicuidad en el medioambiente ha dado lugar a su reconocimiento como contaminantes prioritarios por importantes organizaciones como la

Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (ESFA), el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura conocida como FAO o la propia Organización Mundial de la Salud (WHO). Los expertos han identificado 16 HAPs en los alimentos inequívocamente peligrosos para la salud humana.

Tanto a nivel nacional como internacional, científicos y organismos oficiales están impulsando estudios de biovigilancia para obtener información fidedigna sobre la exposición a diversos contaminantes y sus efectos sobre la salud, información que permitiría establecer medidas correctoras, tendencias o identificar grupos de población más vulnerables a la exposición y grupos de riesgo.

Estos estudios de biovigilancia han hecho crecer la demanda de metodología analítica que proporcione datos fiables de manera rápida y económica atendiendo a la necesidad de controlar y evaluar dicha exposición en el mayor número de individuos. En este tipo de análisis, hay que tener en cuenta que las muestras a analizar suelen ser muy pequeñas, únicas, y las concentraciones a detectar se encuentran en niveles bajos. Por otro lado, se intenta analizar muestras conseguidas de forma no invasivas (orina, excrementos, pelo...), en las que el contaminante, en la mayoría de los casos, se encuentra metabolizado.

En el caso de los HAPs, la presencia en la orina de 1-hidroxipireno (1OHPyr), principal producto de la degradación metabólica del pireno, es utilizado como indicador biológico directo de la entrada de pireno en el organismo e indirecto de los demás HAPs. Diversos estudios han demostrado que el 1OHPyr es un marcador biológico sensible y fiable de los niveles de exposición ambiental, utilizándose para asignar niveles de exposición a determinados contaminantes individuales en circunstancias en las cuales es complicado medir directamente dicho contaminante.

Las tendencias actuales en el desarrollo de métodos analíticos inciden sobre todo en la etapa de preparación de la muestra, mejorando los procedimientos clásicos de forma que se facilite la extracción, la purificación y la preconcentración del analito en muestras complejas, únicas y escasas como las analizadas en los estudios de biovigilancia.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que los HAPs están asociados al aumento en la incidencia de diversos tipos de cáncer, debido a su posible carácter genotóxico y cancerígeno, se hace necesario buscar alternativas metodológicas que minimicen la manipulación y contacto con este tipo de analitos.

Debe además considerarse la tendencia que existe para optimizar los procedimientos analíticos, empleando cada vez volúmenes menores de disolventes y menores tiempos de análisis, reduciendo costes y residuos generados por el empleo de grandes cantidades de disolvente, que presentan una toxicidad considerable y que pueden provocar impactos importantes para el medio ambiente.

Por todas estas razones, esta Tesis Doctoral tiene como objetivo general el desarrollo de nuevos procedimientos para el análisis y la determinación de este tipo de sustancias, en concreto la del biomarcador más ampliamente utilizado, el 1OHPyr en muestras biológicas.

El estudio se va a centrar en la síntesis de nuevos polímeros de impresión molecular (MIP) empleando distintas estrategias de polimerización (por precipitación y en bloque). Los MIPs se van a emplear como material adsorbente en fase sólida con capacidad específica de reconocimiento para el analito 1OHPyr en el desarrollo de nuevos procedimientos de extracción, para posteriormente, ser aplicados a diferentes muestras biológicas humanas (orina y leche materna).

A partir de todo lo anteriormente expuesto, para abordar el desarrollo de esta Tesis se han fijado los siguientes objetivos específicos:

- Optimización de un método cromatográfico para la determinación del 1OHPyr. Como técnica de análisis se ha escogido la cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FD).
- Síntesis de nuevos polímeros de impresión molecular (MIP) específicos para el 1OHPyr, utilizando distintas estrategias de polimerización (por precipitación y en bloque) para la extracción y aislamiento del citado compuesto como biomarcador de la exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- Caracterización morfológica y evaluación mediante estudios de adsorción, de los polímeros impresos y no impresos sintetizados.
- Desarrollo de procedimientos de extracción utilizando los polímeros de impresión molecular sintetizados (por precipitación y en bloque), como adsorbente en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE), para la determinación selectiva de 1OHPyr en muestras de orina, empleando como técnica de medida HPLC-FD.
- Validación de los procedimientos MISPE desarrollados en muestras de orina, llevando a cabo estudios de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y sensibilidad en las condiciones óptimas, incluyendo un estudio de interferencias.
- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en los procedimientos MISPE desarrollados para los MIPs sintetizados con diferentes estrategias de polimerización.
- Aplicación de un MIP como sistema de extracción y aislamiento de 1OHPyr en análisis de inyección en flujo en muestras de orina, y validación del método propuesto. El sistema FIA desarrollado incluye la detección fluorimétrica del analito.
- Desarrollo de diferentes procedimientos de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para la determinación de 1OHPyr en muestras de leche materna humana, incluyendo la utilización de un MIP como soporte sólido de dispersión.

- Validación del procedimiento MIP-MSPD desarrollado en términos de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y sensibilidad en las condiciones óptimas para la determinación de 1OHPyr en muestras de leche materna.

II. Introducción



1. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo numeroso de compuestos orgánicos formados por la condensación de dos o más anillos bencénicos que pueden organizarse formando estructuras lineales, angulares o dispuestos en racimos. El compuesto más sencillo de esta familia es el naftaleno formado por tan sólo dos anillos.

Se originan básicamente en la combustión incompleta a alta temperatura de la materia orgánica. Los HAPs se liberan entonces a la atmósfera o se condensan sobre el material en forma de partículas muy pequeñas. La formación de aerosoles que contienen HAPs permite que puedan ser transportados a grandes distancias, alejados de la fuente de emisión, creando una contaminación difusa no controlada. Pueden encontrarse en el alquitrán de hulla, combustibles fósiles, erupciones volcánicas, incendios forestales, plantas industriales, tráfico de vehículos, calefacciones, humo de cigarrillos, además de generarse en la manipulación de alimentos ahumados, asados al horno o carbón y tostados. Estas fuentes, tanto naturales como antropogénicas, permiten que estén presentes en el aire, el agua, los suelos, los alimentos, u otros productos de consumo, como por ejemplo los cosméticos. Su ubicuidad y persistencia hace que se les considere contaminantes prioritarios [1]. Su presencia y abundancia es tal, que se han detectado en el espacio, formando parte de las moléculas interestelares de las galaxias [2].

Respecto a su toxicidad, se les adjudican tanto propiedades carcinogénicas como mutagénicas, variando estas propiedades de un compuesto a otro dependiendo de su estructura y conformación. Ciertos HAPs tienen una fuerte actividad carcinogénica, particularmente el benzo[a]antraceno (B[a]A) o el benzo[a]pireno (B[a]Pyr). Con otros, en cambio, no existe esta evidencia y por ello no están clasificados como tales, aunque en general, todos los miembros de esta familia, son sospechosos de ser carcinogénicos en uno u

otro grado [3]. Los HAPs por sí mismos no tienen estas propiedades ya que requieren de una activación metabólica de los centros electrófilos que favorezcan esta capacidad [4].

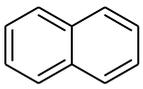
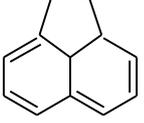
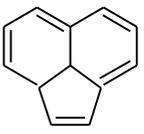
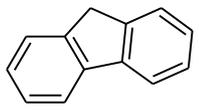
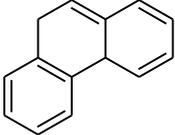
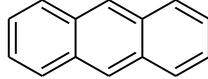
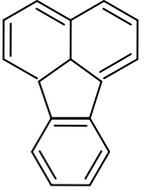
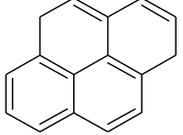
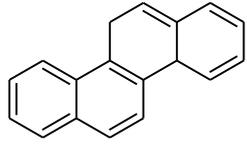
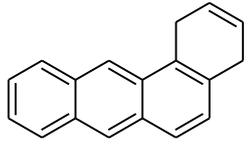
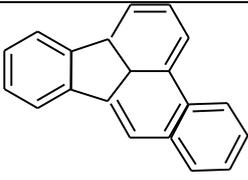
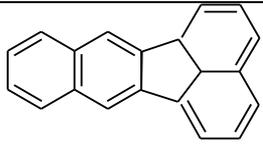
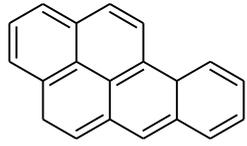
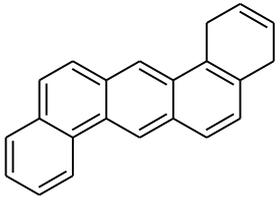
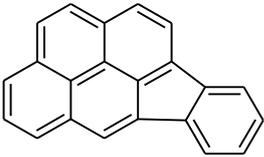
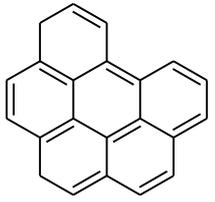
Debido a su abundancia, ubicuidad y persistencia y a los riesgos inherentes a los HAPs, éstos constituyen un grupo de estudio prioritario en los trabajos actuales de biovigilancia [5].

Varios organismos internacionales han fijado el interés y prioridad en 16 de ellos debido a que [6]:

1. Hay más información disponible sobre ellos que sobre los otros HAPs.
2. Se sospecha que son más dañinos que los otros y exhiben efectos nocivos que son representativos de los HAPs.
3. Existe una mayor posibilidad de que la población esté más expuesta a estos HAPs que a los otros.
4. De todos los HAPs analizados, éstos fueron los que se identificaron como los que tenían las mayores concentraciones presentes en los lugares de máximo riesgo.

La estructura de estos 16 HAPs prioritarios, puede consultarse en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Los 16 HAPs prioritarios

Naftaleno	Acenafteno	Acenaftileno	Fluoreno
			
Fenantreno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno
			
Criseno	Benzo[a] antraceno	Benzo[b]fluoranteno	Benzo[k]fluoranteno
			
Benzo[a]pireno	Dibenzo[a,b] antraceno	Indeno [1,2,3-c,d] pireno	Benzo[g,h,i] perileno
			

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los HAPs históricamente fueron los primeros agentes químicos en ser reconocidos como causantes de tumores malignos en humanos.

Ya en 1775, el médico británico Percival Pott [7][7][7] observó una prevalencia elevada entre los deshollinadores de cierta edad de un tipo de cáncer genital, relacionando de esta forma el hollín con la formación del tumor [8].

Cien años después el médico von Volkmann y poco después Joseph Bell volvieron a relacionar, esta vez, los derivados del petróleo, con la incidencia de cánceres en los trabajadores industriales expuestos [4].

Estos indicios han seguido siendo confirmados en años posteriores. En 1918 los patólogos Yamagawa e Ichikawa establecieron una relación entre el cáncer de piel y el alquitrán experimentando con orejas de conejo [9]. La complejidad de la matriz del alquitrán no permitió descubrir qué compuestos eran los responsables de la incidencia del cáncer hasta que Bloch y Dreifuss en 1921 dieron la primera pista sobre las características químicas de los compuestos responsables de la aparición del cáncer en los pacientes [10]. Este grupo químico debía de pertenecer a los hidrocarburos policíclicos.

En esa misma época, Kennaway realizó un experimento sobre sustancias que producían cáncer y obtuvo compuestos carcinogénicos similares sometiendo a alta temperatura o pirolizando materia orgánica [11].

Mayneord y Hieger estudiaron la fluorescencia de estos compuestos comprobando que efectivamente, tanto los compuestos del alquitrán de hulla como los obtenidos por Kennaway eran de la misma familia. Todo esto tuvo como consecuencia la síntesis del dibenzo[a,h]antraceno con lo que se demostraba la capacidad carcinogénica de esta familia.

Posteriormente, de la brea se aisló el benzo[a]pireno, principal responsable del poder carcinogénico del alquitrán de hulla [12].

Demostrada la toxicidad de algunas sustancias químicas de origen antropogénico, los organismos responsables de la salud ambiental se plantearon el reto de vigilar y evaluar la exposición a la que está sometida la población, iniciándose los primeros estudios de biovigilancia.

La determinación de estos químicos o de sus metabolitos en fluidos humanos comenzó en estudios de medicina laboral para la protección de la salud de los trabajadores expuestos, siendo posteriormente extendidos a la población en general. Estados Unidos y Alemania fueron pioneros en este tipo de estudios. En la actualidad, las principales sustancias que se vigilan en este tipo de investigaciones, además de los HAPs son: metales, ftalatos, dibenzodioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDD, PCDF), bifenilos policlorados (PCB), pesticidas, aminas aromáticas, compuestos perfluorados, compuestos orgánicos volátiles y compuestos asociados al humo del tabaco (nicotina y cotinina) [5].

Paralelamente a los estudios de evaluación de la exposición a estas sustancias, se ha generado un desarrollo normativo, a nivel nacional e internacional, para minimizar el riesgo y proteger la salud de la población más expuesta. En este campo existen determinados grupos de sustancias que han adquirido el estatus de sustancias prioritarias debido a su amplia presencia en el medio ambiente y a su toxicidad, siendo objeto de programas de vigilancia y regulaciones internacionales cuya finalidad será la de preservar la calidad del medio ambiente y la salud de la población en general, llegando a estar su generación y producción limitada a unos niveles o en algunos casos prohibida. Ejemplos de ellos son los compuestos orgánicos persistentes o COPs, reguladas en el Convenio de Estocolmo [13]. El objetivo del Convenio de Estocolmo es, por tanto, proteger la salud humana y el medio ambiente de estos COPs, donde además se incluye otros contaminantes ambientales de interés en seguridad alimentaria como

son los metales pesados entre los que se encuentran Hg, Pb, Cd o As y como contaminantes orgánicos persistentes están dioxinas, PCB o los HAPs.

Los COPs reúnen una serie de características que les hacen peligrosos, presentando un riesgo especial y siendo una amenaza para la salud humana y el medio ambiente. Estas características son:

1. Ser persistentes, pudiendo permanecer inalterados durante años o décadas en el medio y en los tejidos de los organismos.
2. Ser liposolubles, acumulándose en los organismos desde el medio a lo largo de las cadenas tróficas.
3. Ser volátiles, por lo que se hace posible el transporte atmosférico y marino a grandes distancias en ciclos sucesivos de depósito y emisión, pudiéndose encontrar por tanto, muy lejos de las fuentes.
4. Ser altamente tóxicos, pudiendo provocar graves efectos sobre la salud y el medio ambiente.

1.2. ORIGEN Y FUENTES DE LOS HAPS. USOS INDUSTRIALES

Como se ha comentado anteriormente, los HAPs tienen principalmente dos tipos de fuentes responsables de su presencia en el ambiente, fuentes naturales y fuentes antropogénicas.

Fuentes naturales:

La presencia de HAPs es debida principalmente a la combustión natural de materia orgánica como pueden ser los incendios forestales o combustibles fósiles. Las erupciones volcánicas también aportan estos compuestos al medio ambiente [14].

Fuentes antropogénicas:

La presencia de los HAPs en el aire está ligada también a procesos de combustión, la quema de combustibles fósiles en actividades industriales, incineración de residuos, calefacciones domésticas, emisión de gases provocadas por vehículos de motor (barcos, aviones, coches y camiones...). Su presencia también es debida a procesos industriales, plantas de generación de energía, incineradoras, industria metalúrgica, especialmente de hierro y aluminio [15, 16]. Se emplean también en la producción de tintas, plásticos, pesticidas y en medicinas. Por lo tanto presentan, en general, una mayor incidencia en países industrializados y zonas urbanas que en otras regiones menos desarrolladas.

Los HAPs, en la actualidad, están implicados en una gran cantidad de usos industriales, así el antraceno es utilizado en la producción de antroquinona, que es un intermediario en la producción de colorantes, participa de la fabricación de fibras sintéticas, plásticos y monocristales y como diluyente para conservantes de madera [17]. También se usa en cortinas de humo, como contador de escintilación, en la investigación de semiconductores orgánicos y en la síntesis de agentes en quimioterapia [18, 19]. De igual forma, el acenafteno se emplea como intermediario en la producción de colorantes, en la fabricación de productos farmacéuticos y plásticos, como insecticida y fungicida [20]. El fluoreno se usa como producto químico intermedio en muchos procesos químicos, en la formación de poliradicales para resinas, y en la fabricación de colorantes [21, 22]. El benzofurano se emplea en la elaboración de resinas [23]. El fenantreno se usa en la producción de colorantes y explosivos y en investigaciones biológicas y síntesis de fármacos [24]. El fluoranteno se usa como material de revestimiento interno para proteger el acero y las tuberías de hierro dúctil para agua potable y en tanques de almacenaje [16, 25]. La creosota, mezcla de HAPs, se emplea como biocida en el tratamiento de la madera. Esta madera puede seguir comercializándose para determinados usos aunque está prohibida, entre otros, emplearla en terrenos de juego, parques, jardines e

instalaciones recreativas y de recreo al aire libre en los que exista el riesgo de contacto frecuente con la piel [26].

Por otra parte, hábitos sociales como el consumo de tabaco se relacionan directamente con los HAPs. El humo del tabaco, tanto inhalado como expulsado contiene cantidades importantes de esta familia de hidrocarburos [27].

Otra fuente importante de HAPs es la pirolisis de los alimentos. Los carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos presentes en el propio alimento generan HAPs (reacciones de Maillard), incrementándose cuando entran en contacto directo con la llama (parrillas, barbacoas), siendo depositados en la superficie de los mismos. Además, todo proceso de pardeamiento no enzimático, como puede ser el tostado de derivados de cereales, en la elaboración del pan o en el ahumado de carnes y pescados, provoca su aparición, absorción y acumulación [3].

Raramente la exposición a los HAPs es debida a una sola fuente, sino a una mezcla de ellas. La presencia de los HAPs en el aire debida a procesos de combustión o industriales hace que la vía de exposición más común sea la respiratoria. La presencia en el aire en forma gaseosa, la formación de aerosoles o la adhesión a pequeñas partículas sólidas puede llevar estos contaminantes a lugares alejados de la fuente pudiendo depositarse también en el suelo y en las masas de agua. En determinados ambientes interiores, algunos trabajadores están expuestos debido a las emisiones de los diversos procesos de producción. También en situaciones habituales, el consumo de tabaco es a veces la principal fuente de HAPs que afecta tanto a fumadores como a no fumadores.

Por otro lado, la dieta contribuye de forma importante a la exposición a los HAPs y determinados hábitos culinarios y alimenticios ligados a los usos y costumbres personales incrementan la exposición (pan, café, ahumados...) [28].

1.3. PRINCIPALES VÍAS DE EXPOSICIÓN

1.3.1. Vía inhalatoria

Como se ha expuesto en el apartado anterior los HAPs están presentes en el aire, entrando a través de los pulmones al respirar. Esto puede ser debido a la inhalación de humo de tabaco, aire contaminado de zonas industrializadas, tanto debidos a fábricas como a vehículos, inhalación de desechos industriales o inhalación de humo en incendios. En zonas rurales los niveles suelen oscilar entre los 0,02 y 1,2 ng/m³, mientras que en urbanas se detectan del orden de 1,15-20 ng/m³. Estas concentraciones suelen aumentar en los meses de invierno debido sobre todo al aumento de emisiones industriales, tráfico de vehículos y calefacciones domésticas cuyo uso se incrementa durante este período [29].

Para algunos trabajadores el ambiente laboral es la principal fuente de exposición a los HAPs, siendo la vía inhalatoria la vía de exposición principal. Aunque también se puede producir su absorción por la piel al estar en contacto directo con estas sustancias. Dentro de las actividades industriales cuyo margen de exposición ocupacional es mayor, destacan la industria metalúrgica y siderurgia, hornos de coque, destilación de alquitrán, betún o creosota, aplicaciones del alquitrán y asfalto, refinado de petróleo, trabajo con carbón, industria de goma y caucho, incineración de residuos, operarios de maquinaria y automóviles y ahumadores de alimentos [25, 30].

1.3.2. Vía digestiva

Una importante vía de exposición es la dieta, debido al consumo de agua o alimentos que contengan HAPs, ya sea por contaminación en su origen como por generación de los mismos en su manipulación o procesado, tales como vegetales, cereales y lácteos procedentes de suelos o atmósferas contaminadas. También pueden encontrarse HAPs en carnes cocinadas en barbacoa, pescados o alimentos con contenido en grasas donde pueden acumularse, frutos

o semillas, aceites, etc. El contenido de B[a]Pyr en alimentos asados oscila en torno a 0,17-10,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dependiendo del alimento y viendo su cantidad aumentada con el contenido en grasa. El pescado ahumado contiene niveles relativamente elevados del orden de 4-16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B[a]Pyr, consecuencia de la combustión de madera necesaria para su elaboración. Las referencias de HAPs en agua potable oscilan entre los 4 y 24 ng/L [31].

1.3.3. Vía dérmica

La exposición a los HAPs por vía dérmica puede producirse al entrar en contacto con partículas del suelo contaminado, o productos tales como la creosota. También debido al uso de algunos medicamentos en los que se emplean en su composición diversos hidrocarburos (tratamiento de eccemas, psoriasis o dermatitis), o por contacto directo con estas sustancias [29, 32].

1.4. RUTA METABÓLICA DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

La biotransformación de los HAPs involucra una serie de enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (enzimas del citocromo P-450-CYP) y de enzimas que catalizan reacciones de conjugación (sulfotransferasa, epóxido hidrolasa, glutatión, S-transferasa y UDP-glicotransferasa). Estos sistemas enzimáticos se encuentran distribuidos a lo largo de todos los tejidos del organismo [32]. El proceso metabólico tiene lugar principalmente en el hígado aunque puede darse en otros tejidos metabólicamente activos. Los HAPs son primeramente oxidados a mono y dihidroxiderivados, conjugando la molécula de glutatión para conseguir su solubilidad en medio acuoso, favoreciendo de este modo su eliminación por la orina como glucurono y sulfo conjugados. En la oxidación también se producen epóxidos, muy reactivos, que le dan al compuesto su capacidad genotóxica [33]. Un paso crítico en la carcinogénesis de los HAPs en los mamíferos parece ser debido al enlace

covalente de las especies metabólicas a los residuos nucleofílicos, entre los que se incluye el ADN [34].

Se ha sugerido que el metabolismo de los compuestos tiene como finalidad aumentar la polaridad de los mismos, haciéndolos más hidrosolubles y más fáciles de excretar por vía fecal y urinaria. Aprovechando esta característica, se puede realizar la determinación de los metabolitos presentes en orina y por tanto medir la exposición sufrida.

Aunque este proceso conduce en su mayor parte a una detoxificación, hay algunos HAPs que se activan a especies más reactivas. El B[a]Pyr, siendo uno de los HAPs más importantes y estudiados, es un cancerígeno que es bioactivado en el hígado, concretamente en el retículo endoplasmático liso (fracción microsómica) de los hepatocitos que contienen gran cantidad de citocromo P-450. Mediante un proceso de oxidación enzimática se forma un epoxidol, molécula altamente electrófila, ya que adiciona iones H^+ transformándose en un catión muy estable electrófilo que puede inducir la aparición de un posible cáncer. Esto es así debido a que en vez de eliminarse, se liga con el ADN celular, que al igual que las proteínas y los lípidos, son moléculas nucleófilas, lo que impide que las células se reproduzcan de forma natural [35]. El metabolismo del B[a]Pyr es uno de los ejemplos más estudiados de los procesos de bioactivación, en los cuales los productos del metabolismo resultan ser más tóxicos que los productos de partida. Este efecto de la biotransformación ocurre cuando se producen especies químicas muy reactivas, como pueden ser los compuestos electrofílicos, y con gran afinidad por las moléculas nucleófilas como son los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos [36]. La Figura 1.1 esquematiza este proceso. El epoxidol formado por la oxidación enzimática será el que reaccionará posteriormente con el ADN formando un aducto, pudiendo provocar posteriormente fallos en la multiplicación celular.

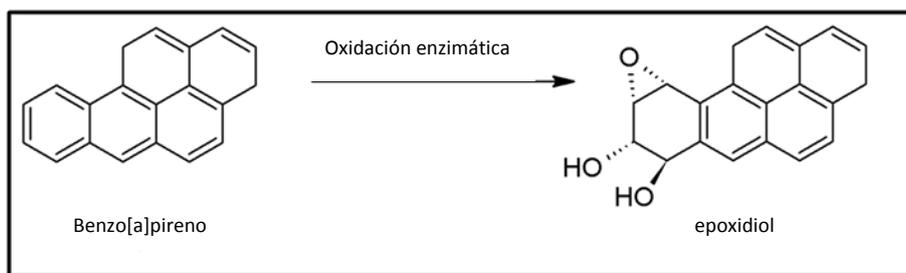


Figura 1.1. Oxidación enzimática del B[a]Pyr

La ruta metabólica que sigue este tipo de compuestos se explica en dos etapas [37]:

Reacciones de primera fase o biotransformación: que incluyen oxidaciones, hidroxilaciones y reducciones. Se introduce un nuevo grupo funcional para que la molécula adquiera polaridad y sea excretada con facilidad. Las enzimas que intervienen en este proceso son del tipo citocromo P-450.

Reacciones de segunda fase o conjugación: en las que se producen síntesis de conjugados mediante la adición enzimática de nuevos grupos como pueden ser el ácido sulfúrico o ácido glucurónico, que se dan en el grupo funcional presente en la molécula o que se han originado en la primera etapa. Las enzimas en este caso son las glutatión-S-transferasa o la sulfotransferasa. En esta fase se incrementa aún más la hidrosolubilidad de la molécula resultante.

La ruta metabólica del B[a]Pyr es la que mejor se conoce. La Figura 1.2 representa de forma esquemática esta ruta metabólica.

Igualmente, se han realizado algunos estudios de eliminación de metabolitos a través de la leche en rumiantes [38-43], aunque la eliminación de los HAPs mediante su excreción en esta matriz ha sido poco estudiada hasta el momento.

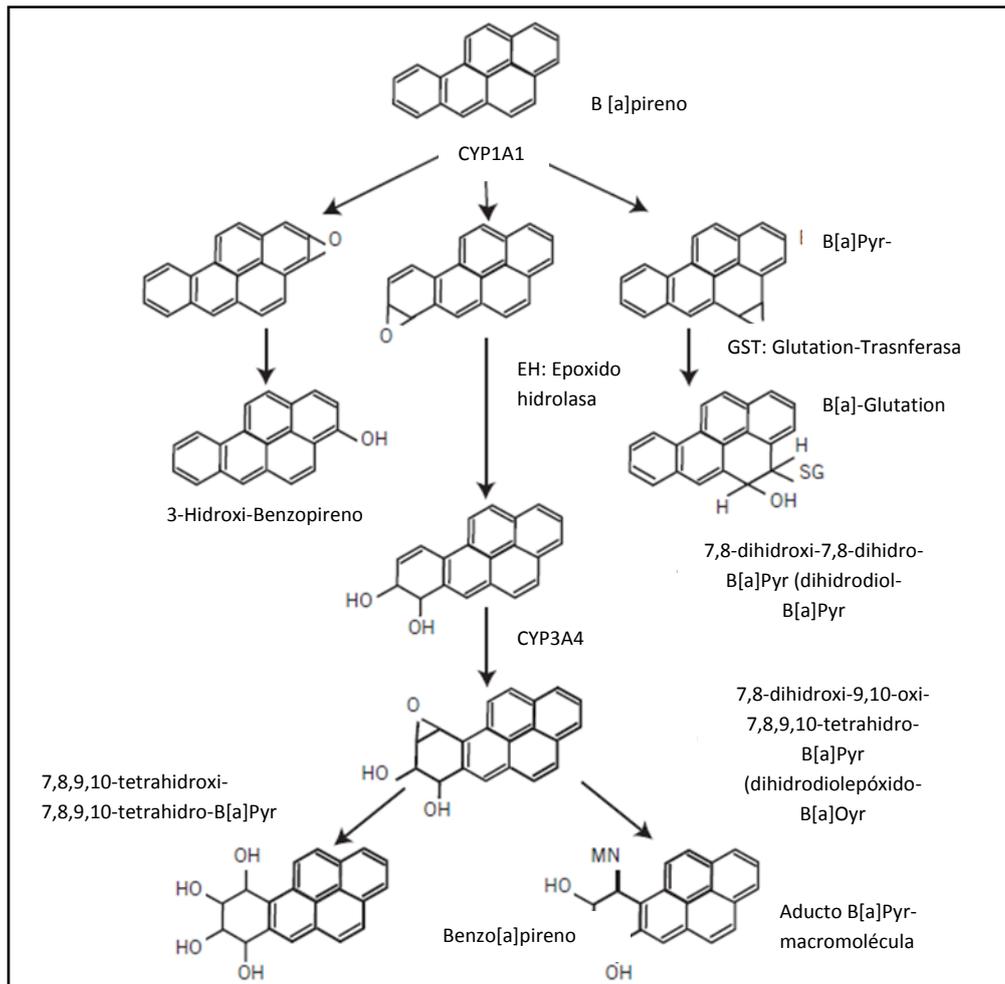


Figura 1.2. Ruta metabólica del B[a]Pyr [32]

1.4.1. Metabolismo del pireno

La biotransformación del pireno (Pyr) en 10HPyr y su posterior transformación en sus conjugados solubles pueden consultarse en la Figura 1.3 [44].

La biotransformación del Pyr incluye una serie de enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (enzimas del citocromo P450 CYP), así como enzimas que catalizan reacciones de conjugación (sulfotransferasas, epóxido hidrolasa, glutatión S-transferasa y UDP-glicotransferasas).

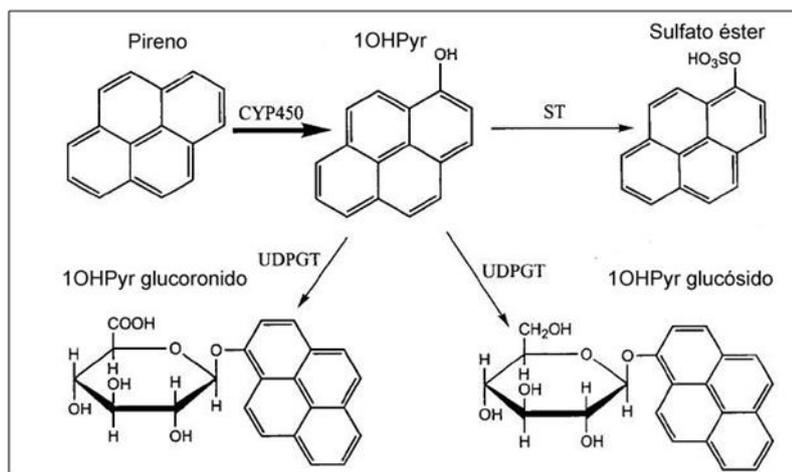


Figura 1.3. *Metabolismo del pireno [44]*

El metabolismo del Pyr pasa por dos etapas. En la fase I, las mono-oxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP IA), una familia de enzimas, oxida el Pyr añadiendo un grupo hidroxilo en la posición 1 y formando de esta forma el 1OH-Pyr, el principal metabolito del pireno. El 1OH-Pyr puede volver a oxidarse por otros citocromos P450, formándose el 6-dihidrodiol o 1,8-dihidrodiol pireno. Cuando actúa el citocromo P450 IIB se forma el 5 epoxi, 4,5-dihidropireno y el 4,5-dihidrodiolpireno.

En la segunda fase metabólica, estos metabolitos pasan a conjugarse con las enzimas tipo glucuronosil transferasa/sulfotransferasa y glutatión-s-transferasa formándose los derivados conjugados carbohidrato o sulfato, para que puedan ser excretados por el cuerpo principalmente por la orina [45].

Las rutas de eliminación principal son la bilis, orina y las heces [46]. Se ha observado que el 1OH-Pyr encontrado en orina es 10 veces mayor que el encontrado en leche, en concordancia con el hecho de que la orina es la mayor ruta de eliminación de los xenobióticos [47].

La presencia en orina del 1OH-Pyr tiene, por tanto, una correlación significativa con la exposición total a HAPs. Aunque el Pyr no es considerado cancerígeno y sus efectos

genotóxicos son limitados, es un compuesto que está presente en grandes concentraciones en el medio ambiente, por lo que sus metabolitos también lo estarán en la orina. Este es el principal motivo por el que el 1OHPyr es habitualmente elegido como marcador biológico de presencia de HAPs. Esta información sobre la concentración de 1OHPyr ofrece valores de referencia para que se puedan determinar los niveles de exposición a estos compuestos.

1.5. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Los principales impactos de los HAPs en la salud humana se centran en sus propiedades genotóxicas, es decir, aquellas propiedades donde se causa un daño al material genético (aspectos teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos). Su capacidad genotóxica es la que más preocupa en este sentido. Los HAPs, o sus metabolitos, son capaces de captar electrones e interactuar con moléculas tales como el ADN. La evaluación y control de la exposición humana a las sustancias que presentan dicha actividad permiten minimizar el impacto sobre la salud humana, ya que la mayoría de los cánceres resultan de interacciones genéticas y ambientales, siendo éstas últimas las más importantes y las que mayores factores pueden ser susceptibles de ser estudiadas.

Por tanto, una vez los HAPs han entrado en el organismo, pueden ocurrir procesos de biotransformación o biodegradación, que serán los que dicten el contenido de contaminante en dicho organismo y por tanto, su toxicidad.

La forma de entender el riesgo toxicológico que suponen los HAPs es mediante el conocimiento de la fracción disponible para los organismos (niveles residuales) y los mecanismos de toxicidad que se generan en el interior de los seres vivos [48]. En el primer caso, esto va a depender de las propiedades físico-químicas de las propias sustancias (solubilidad en agua, volatilidad, carácter hidrofóbico, fotodegradación) y en el segundo caso va a depender de la actividad biológica. Del segundo factor se encargará la degradación

microbiana, la cinética de los procesos tóxicos, la biotransformación y el carácter mutagénico y carcinogénico del HAP concreto.

Partiendo de lo expuesto anteriormente, se introduce el concepto de biodisponibilidad. Este concepto hace referencia a la fracción de compuesto presente en el suelo, aire o agua, que puede ser potencialmente transferida a los tejidos de un organismo.

Hay que añadir que los efectos de los HAPs sobre la salud humana están directamente relacionados con el mecanismo de contaminación que se produce principalmente por la vía inhalatoria. En la atmósfera, los HAPs se distribuyen atendiendo a las condiciones ambientales y las propiedades físico-químicas del compuesto. Las partículas de HAPs son capaces de alcanzar las vías respiratorias donde los procesos de eliminación son lentos. Esto puede llegar a provocar cáncer de pulmón y otras enfermedades crónicas, siendo las partículas más pequeñas las que tienen un mayor tiempo de residencia, manteniendo por tanto un contacto directo con la membrana celular. Esto aumenta la posibilidad de absorción por el cuerpo debido a la deposición de partículas [49].

En cuanto a la biodisponibilidad de HAPs en aguas, está limitada para compuestos con un coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) superior a 5. El tiempo de contacto entre los HAPs y los sedimentos hace que se vaya reduciendo su biodisponibilidad. En hábitats terrestres, se enlazan principalmente a la fracción orgánica del suelo (horizontes superiores), por la similitud de polaridades. Debido a las grandes fluctuaciones en el contenido de agua de los suelos (evaporación, drenaje, lluvias...), los procesos de partición de HAPs son muy dinámicos, y no suelen predominar las condiciones de equilibrio [50].

Como se ha mencionado, los HAPs pueden presentar propiedades genotóxicas y mutagénicas así como ser carcinógenos y ser además posibles disruptores endocrinos [51]. Los disruptores endocrinos son sustancias químicas que afectan a la actividad normal de las funciones hormonales en animales pudiendo simular ciertas hormonas, produciendo

respuestas similares o bien bloquearlas, inhibiendo su actividad endocrina. Este efecto ocurre principalmente en niños cuyas madres se han visto expuestas durante el embarazo y la lactancia [52]. Los HAPs son metabolizados y los compuestos formados pueden reaccionar covalentemente con el ADN celular y otras macromoléculas como pueden ser proteínas o ácidos nucleicos. Los aductos de ADN dan lugar a mutaciones que se producen durante la replicación o reparación del ADN, pudiéndose activar procesos teratogénicos o cancerígenos. Para poder expresar esta capacidad carcinogénica, los reactivos intermedios deben sufrir una “bioactivación”, es decir, ser activados metabólicamente por la enzima del tipo citocromo P450 y las epoxi hidrolasas. De esta forma, en vez de producirse un metabolito menos tóxico que el compuesto de partida y ser excretado fácilmente, se ha generado un producto intermedio que da lugar a un proceso de inhibición de las hormonas o la aparición de un cáncer por impedimento de reproducción celular adecuada. Un ejemplo de una molécula con éste tipo de comportamiento sería el 3-hidroxibenzo[a]pireno (3OHB[a]Pyr). Esta molécula tiene tanto la capacidad de unirse covalentemente al ADN como, debido a su estructura, sustituir al estradiol como hormona.

Estos mecanismos de toxicidad son específicos por varios motivos:

1. Sólo ciertos HAPs son activados metabólicamente y registrados como cancerígenos.

Este es el caso del B[a]Pyr.

2. No todos los organismos poseen un sistema enzimático capaz de metabolizar los HAPs. Los efectos serán especialmente dañinos en el caso de organismos que no posean mecanismos de reparación de su ADN celular.

3. Tener una estructura similar a las hormonas esteroideas. El HAPs debe poseer al menos cuatro anillos aromáticos y metabolizar a partir de grupos fenólicos o quinonas.

Todos estos aspectos toxicológicos van a depender de la estructura del compuesto, así como de su forma, de su tamaño y de la presencia de sustituyentes en determinadas regiones del anillo bencénico. Aunque no todos los miembros de la familia presentan estas características, la gran mayoría de ellos, pueden llegar a ser irritantes sobre piel y mucosa.

Entre sus propiedades físico-químicas destacan su baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en sustancias lipídicas, que implica que se puedan acumular en los organismos, en la materia orgánica y en los sedimentos, persistiendo por tanto en la naturaleza. Esta persistencia del compuesto aumenta al aumentar el tamaño de la molécula. Por ejemplo, la baja persistencia del naftaleno debido a su bajo peso molecular contrasta con la persistencia y bioacumulación del B[a]Pyr. Esta bioacumulación puede hacer que se determinen HAPs y/o sus metabolitos en diversos fluidos biológicos. Es por este motivo que puede ser susceptible de contaminar la leche materna, tanto humana como la que proviene de pequeños rumiantes y de la que derivan los productos lácteos de consumo diario (leche, yogures, quesos...) [53]. Además, hay estudios que relacionan la exposición prenatal de estas sustancias al retraso y crecimiento intrauterino asociado a su vez con problemas respiratorios en niños. Factores como el tabaquismo, la dieta o polución del aire, son determinantes en el aumento de niveles de HAPs de la madre [54].

Por tanto, la evaluación y análisis de estos factores serán un componente fundamental para la toma de decisiones de las agencias y administraciones, con objeto de determinar la necesidad y naturaleza de las acciones que deben emplearse, y así evitar las consecuencias toxicológicas de la exposición a estos compuestos.

1.6. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

En su forma pura, los HAPs son sólidos incoloros o con un color amarillo o verde pálido. A temperatura ambiente son sólidos con alto punto de fusión y ebullición y baja presión de vapor. Son lipofílicos, tanto mayor cuanto mayor es su peso molecular, por lo que suelen ser insolubles en agua [55]. Su coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) se sitúa en el rango de 3,4-6,5. Estos altos coeficientes de partición indican que pueden ser absorbidos a través de los diferentes tejidos biológicos, tales como la piel [56]. Los HAPs son compuestos no polares o muy débilmente polares, que tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas, presentando una baja solubilidad en agua. Dicha solubilidad disminuye con el aumento del tamaño de la molécula y, con la excepción del naftaleno, que es relativamente soluble, los HAPs no suelen presentar solubilidad en dicho medio. Su coeficiente de reparto entre el carbono orgánico y agua (K_{oc}) también es alto, por lo que en sistemas acuosos tienden a concentrarse en los sedimentos o se asocian a la materia orgánica en suspensión, lo que explica su persistencia en el medio ambiente. Dicho coeficiente de partición de carbono orgánico es una medida de la tendencia de las sustancias orgánicas para ser absorbidas por el suelo y los sedimentos. Es específica de cada sustancia e independiente de las propiedades del suelo. La presión de vapor y la constante de Henry disminuyen de igual forma con el aumento del peso molecular. Esto significa que los hidrocarburos de entre 2 ó 3 anillos tienden a concentrarse en la fase gaseosa del aire, mientras que los de mayor número de anillos se concentran en las partículas atmosféricas [57].

Por otra parte, los HAPs son compuestos relativamente inertes y sus reacciones más comunes son las reacciones de sustitución o adición electrófila. Como este tipo de reacciones destruye la aromaticidad del sistema conjugado y por tanto se da una disminución en la estabilidad de la molécula, a menudo son seguidas por reacciones de eliminación que regeneran el sistema aromático. Su energía de resonancia es menor que la del benceno. A

medida que va aumentando el número de anillos aromáticos, va disminuyendo la energía de resonancia y debido a esto, como no están tan fuertemente estabilizados como el benceno, con frecuencia participan en reacciones de adición. Reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce la saturación, aunque tienden a conservar el sistema de anillos [32].

Los HAPs son inestables fotoquímicamente [58]. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos que derivan a quinonas [32]. Esta degradación se incrementa con la alta temperatura, bajo atmósfera de oxígeno o en medio acuoso. El proceso de degradación metabólica da mayoritariamente metabolitos hidroxilados.

Es evidente que las propiedades físico-químicas de estos compuestos están determinadas en gran medida por su sistema de enlaces dobles conjugados que varían con el número de anillos y por lo tanto con su peso molecular. De los valores de algunas constantes físico-químicas se desprenden conclusiones relevantes para la comprensión del comportamiento ambiental y toxicológico de estos compuestos, los cuales se muestran en la Tabla 1.2. Esta tabla recoge las distintas propiedades físico-químicas de alguno de los HAPs más representativos de la familia [25]: El número CAS es el número de identificación que asigna la Sociedad Química Americana a las distintas sustancias químicas; El peso molecular (PM), que viene expresado en g/mol. Se numeran también los puntos de fusión y ebullición en ° C. La presión de vapor (Pv) representa la presión que ejercen las moléculas en estado vapor que han sido proyectadas fuera de la masa de la disolución en la que se encuentre la sustancia (expresada como mm Hg). En general, los HAPs presentan una presión de vapor baja, lo que posibilita que puedan viajar largas distancias en la atmósfera antes de regresar a la tierra en forma de agua de lluvias o por asentamiento de partículas.

La solubilidad (Sol) muestra la máxima concentración del compuesto capaz de disolverse en el agua. Se mide en unidades de concentración (mg/L). Por lo general, los HAP tienen una solubilidad baja por lo que no se disuelven fácilmente en el agua.

Otra propiedad representada en la Tabla 1.2 es la constante de la ley de Henry (H). Dicha constante describe la tendencia de un compuesto a volatilizarse, que será mayor cuanto más alto sea el valor de H. Los HAPs presentan valores bajos de la constante de la ley de Henry. Dicha constante está directamente relacionada con la presión de vapor mediante la ecuación propuesta por Henry.

Por último, el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) es una medida de cómo un compuesto puede distribuirse entre dos disolventes inmiscibles, agua (disolvente polar) y octanol (disolvente relativamente no polar, que representa a los lípidos). Se calcula dividiendo la concentración que presenta la sustancia en el octanol entre la que presenta en el agua. Se emplea para estimar la distribución del compuesto en un tejido de grasa animal. De esta forma, cuanto mayor sea este valor, mayor tendencia tendrá el compuesto a bioacumularse. Los HAPs presentan valores elevados del $\log K_{ow}$, lo que indica su predisposición a ser bioacumulados por los organismos vivos, de ahí su toxicidad y acumulación dentro del organismo.

En esta tabla se incluye también una clasificación de su potencial cancerígeno (PC), atendiendo a su potencial en humanos según la Agencia Internacional en la Investigación del Cáncer (IARC) y la EPA.

Dichas agencias clasifican estos compuestos en probablemente cancerígenos en humanos (2A), posiblemente cancerígenos en humanos (2B), no calificables como cancerígenos en humanos (3) y no experimentado en humanos (NE).

De esta tabla se sacan varias conclusiones [59-61], pudiendo dividir los HAPs en dos grandes grupos si atendemos a su estado físico determinado tanto por la presión de vapor como por la temperatura. A presiones de vapor superiores a 1×10^{-5} kPa suelen encontrarse en fase gaseosa. A 25 °C, los compuestos de tres anillos se encuentran principalmente en fase vapor, mientras que los de número de anillos superiores se distribuyen entre fase sólida y vapor. Los HAPs con seis anillos se encuentran exclusivamente en fase sólida. Las presiones de vapor cambian alrededor de un orden de magnitud cuando la temperatura varía 15 °C.

Los HAPs poseen propiedades lipofílicas. Aquellos con altos pesos moleculares son generalmente insolubles en agua, siendo su afinidad para absorberse en las superficies de las partículas suspendidas en el aire y en el agua muy elevada. Su $\log K_{ow}$ suele ser superior a 5.

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas de HAPs

HAP	PC	CAS	PM (g/mol)	PF (° C)	PE (° C)	Pv (mm Hg)	Sol (mg/L)	H (atm×m ³ /mol)	Log K _{ow}
Acenafteno	NE	83-29-9	154,21	95	96,2	$4,47 \times 10^{-3}$	1,93	$7,91 \times 10^{-5}$	3,98
Acenaftileno	NE	208-96-8	152,2	92	270	0,029 (20°C)	3,93	$1,45 \times 10^{-3}$	4,07
Antraceno	3	120-12-7	178,2	218	342	$1,7 \times 10^{-5}$ (25 °C)	0,76	$1,77 \times 10^{-5}$	4,45
Benzo(a)antraceno	2A/B2	56-55-3	228,29	159	400	$2,2 \times 10^{-8}$ (20°C)	0,01	$1, \times 10^{-6}$	5,61
Benzo(a)pireno	2A/B2	50-32-8	252,3	179	311	$5,6 \times 10^{-9}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-7}$	6,06
Benzo(e)pireno		192-97-2	252,3	179	311	$5,7 \times 10^{-9}$ (25°)	$6,3 \times 10^{-3}$ (25°C)	-	-
Benzo(b)fluoranteno	2B/B2	205-99-2	252,3	168,3	-	5×10^{-7} (20-25 °)	0,0012	$1,22 \times 10^{-5}$	6,04
Benzo(j)fluoranteno		205-82-3	252,3	166	-	$1,5 \times 10^{-8}$	$6,76 \times 10^{-3}$ (25°C)	1×10^{-6}	6,12
Benzo(k)fluoranteno	2B	207-08-9	252,3	215,7	480	$9,59 \times 10^{-11}$ (25°)	$7,6 \times 10^{-4}$ (25°C)	$3,87 \times 10^{-5}$	6,06
Benzo(g,h,i)perileno	3	191-24-2	276,34	273	550	$1,03 \times 10^{-10}$ (25°C)	$2,6 \times 10^{-4}$ (25°C)	$1,44 \times 10^{-7}$	6,5
Criseno	3/B2	218-01-9	228,3	256	448	$6,3 \times 10^{-7}$ (25°C)	$2,8 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-6}$	5,56
Dibenzo(a,h)antraceno	2A/B2	53-70-3	278,35	262	-	1×10^{-10} (20°C)	5×10^{-4}	$7,3 \times 10^{-8}$	6,84
Fenantreno	3	85-01-8	178,2	100	340	$6,8 \times 10^{-4}$ (25°C)	1,2	$2,56 \times 10^{-5}$	4,45
Fluoranteno	NE	206-44-0	202,26	11	375	5×10^{-6} (25°C)	0,26	$6,5 \times 10^{-6}$	4,9
Fluoreno	NE	86-73-7	166,2	117	295	$3,2 \times 10^{-4}$ (20°C)	1,98	1×10^{-4}	4,18
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	2B/B2	193-39-5	276,3	163,6	530	1×10^{-6} (20°C)	0,062	$6,95 \times 10^{-8}$	6,58
Pireno	3	129-00-00	202,3	156	404	$2,5 \times 10^{-6}$ (25°C)	0,077	$1,14 \times 10^{-5}$	4,88

1.6.1. Fenómenos de fluorescencia

La mayoría de los HAPs son compuestos fluoróforos, es decir presentan fluorescencia. La emisión luminiscente va a depender de la estructura molecular del compuesto. En concreto, en el caso de los HAPs, esta propiedad es debida a la rigidez que les confiere la estructura aromática, con electrones π deslocalizados y distribuidos a través de toda la molécula. Este sistema conjugado de orbitales π proporciona una estructura molecular que les hace químicamente estables. Los HAPs absorben luz ultravioleta y al emitirla producen un espectro de fluorescencia característico de cada compuesto que puede ser empleado para identificarlos con ayuda de un detector fluorimétrico [62].

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Este proceso se produce porque las moléculas tienen diferentes estados llamados niveles de energía donde los electrones se encuentran ocupando dichos niveles. En fluorescencia estos niveles se refieren a estados vibracionales y electrónicos. Las moléculas que presentan fluorescencia tendrán un estado electrónico basal (S_0), o estado de baja energía, y un estado electrónico excitado de mayor energía (S_1). Dentro de cada uno de estos estados electrónicos hay diferentes estados vibracionales [63]. Un esquema de lo anteriormente expuesto puede consultarse a través de la Figura 1.4. El diagrama representado se denomina diagrama de Jablonski e ilustra los estados electrónicos de una molécula y las transiciones que se pueden producir entre estos estados [64].

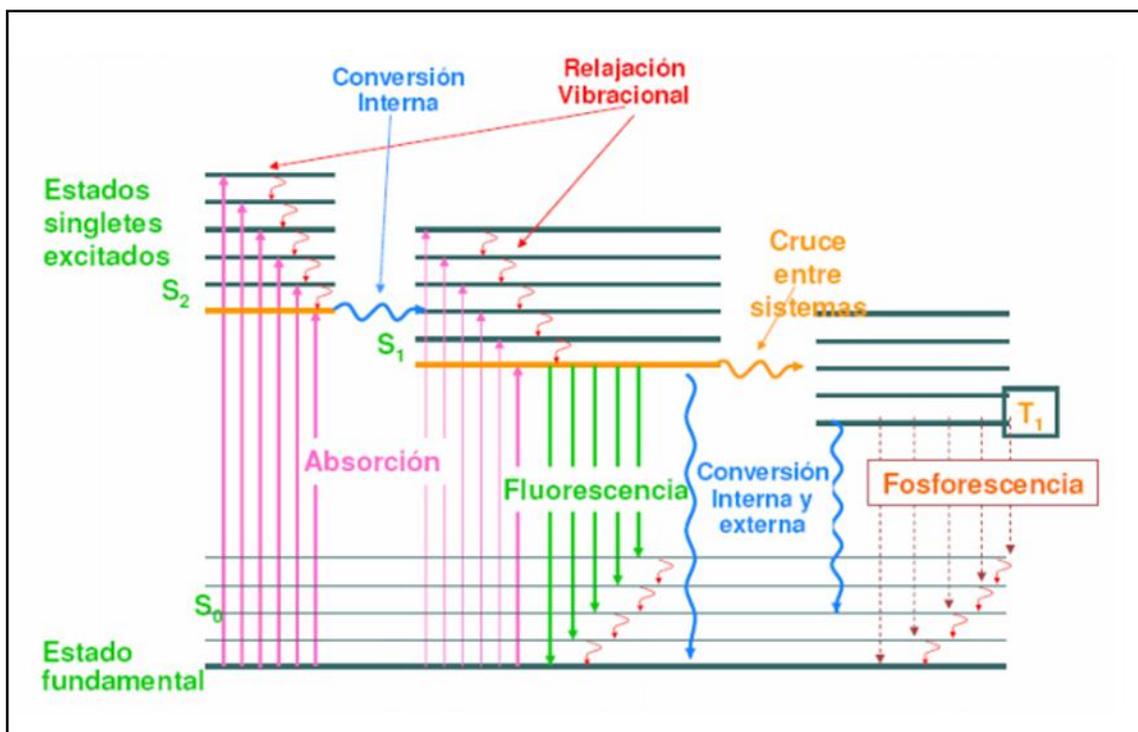


Figura 1.4. Diagrama de Jablonski [64]

Cuando una molécula absorbe un fotón con energía ($h\nu$) de excitación, uno de sus electrones π salta a un nivel de mayor energía y la molécula se dice que se ha promovido desde un estado basal S_0 a un estado singlete S_1 superior. Normalmente el tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque existen mecanismos de liberación de energía que hacen retornar al estado fundamental. Las colisiones con otras moléculas causan que la molécula excitada pierda energía vibracional hasta que alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado. En este caso se habla de relajación vibracional, señalada por las flechas onduladas cortas de la Figura 1.4, entre los niveles de energía vibracionales. La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso, es decir, el electrón vuelve de este estado excitado al estado basal. Dicho fotón, con menor energía, es decir, con mayor longitud de onda, es entonces emitido, siendo este proceso conocido como fluorescencia de emisión o

fotoluminiscencia [65], representado por las flechas continuas de color verde del diagrama de Jablonski de la Figura 1.4.

La fluorescencia está limitada, por tanto, a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales que hacen que la velocidad de los procesos de desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto que la reacción de emisión pueda competir cinéticamente produciendo dicha emisión. A esto hay que añadir que tanto las longitudes de onda de excitación como las de emisión son características de cada molécula, por lo que se puede concluir que la fluorescencia es un proceso muy particular.

La fluorescencia más intensa la presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos como es el caso de los HAPs, particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La eficacia cuántica, es decir, la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas, es alta, aumentando ésta con el número de anillos y su grado de conjugación. La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima. En general, los HAPs con pocos anillos aromáticos requieren grandes energías de excitación (cortas longitudes de onda), mientras que las moléculas de mayor número (5 o más anillos) requieren menores energías [66]. Por ejemplo, el pireno (Pyr) tiene una gran capacidad de llevar a cabo el fenómeno de emisión de fluorescencia, debido a su alta conjugación al estar constituido por cuatro anillos aromáticos fusionados. El Pyr posee un alto rendimiento cuántico y un tiempo de vida extendido en el estado excitado [67].

Se puede concluir entonces que, como consecuencia de la especificidad de los procesos de fluorescencia, los HAPs van a presentar propiedades únicas para su determinación, siendo ésta una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia, ya que aportan a la metodología analítica una selectividad y sensibilidad inherentes al propio método. Las longitudes de onda a las cuales las moléculas son excitadas y

en las cuales emiten fluorescencia son características de cada compuesto. Por ejemplo, en mezclas que contengan varias estructuras, las diferentes propiedades fluorimétricas de cada uno de los HAPs podrán dar una identificación preliminar de los compuestos.

2. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y SUS BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

2.1. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE BIOVIGILANCIA

Los estudios de biovigilancia, sobre todo de poblaciones humanas que están laboralmente expuestas a diferentes agentes, suscitan en la actualidad la atención y dedicación de muchos laboratorios y agencias de control, suponiendo un gran esfuerzo de investigación en campos tan diversos como la toxicología, la Química Analítica o la epidemiología. Es una herramienta de gran utilidad para la protección de la salud frente a la exposición de sustancias químicas que es llevada a cabo a través de un análisis sistemático de contaminantes y/o sus metabolitos en muestras biológicas.

Para la evaluación del riesgo es imprescindible conocer la exposición de la población general. El conocimiento preciso de las concentraciones de los contaminantes en las matrices ambientales permite evaluar la exposición de los diferentes grupos de población y por lo tanto, estimar el riesgo asociado a su presencia. Sin embargo, la evaluación de la exposición ambiental externa no es suficiente para valorar el riesgo, ya que la presencia de sustancias químicas en estas matrices no implica su absorción por el organismo ni el desarrollo de efectos adversos sobre la salud humana. Es por ello necesario introducir un segundo aspecto dentro de la biovigilancia que evalúe la dosis interna de contaminante realmente incorporada en el organismo [68].

De estos aspectos se encarga la biovigilancia o biomonitorización humana (HBM). La HBM es una herramienta de gran utilidad para la protección de la salud frente a la exposición de sustancias químicas que, a través de una metodología sistemática de recogida de muestras biológicas, su posterior determinación y la de sus metabolitos, o la de otros parámetros biológicos, compara los niveles observados con valores de referencia. De esta forma, evalúa la

exposición a las sustancias presentes en el medio ambiente, permitiendo determinar su potencial riesgo para la salud [69].

La Figura 2.1 muestra un esquema de lo anteriormente expuesto, añadiendo la importancia del desarrollo de métodos analíticos adecuados que determinen cuantitativamente esta exposición.

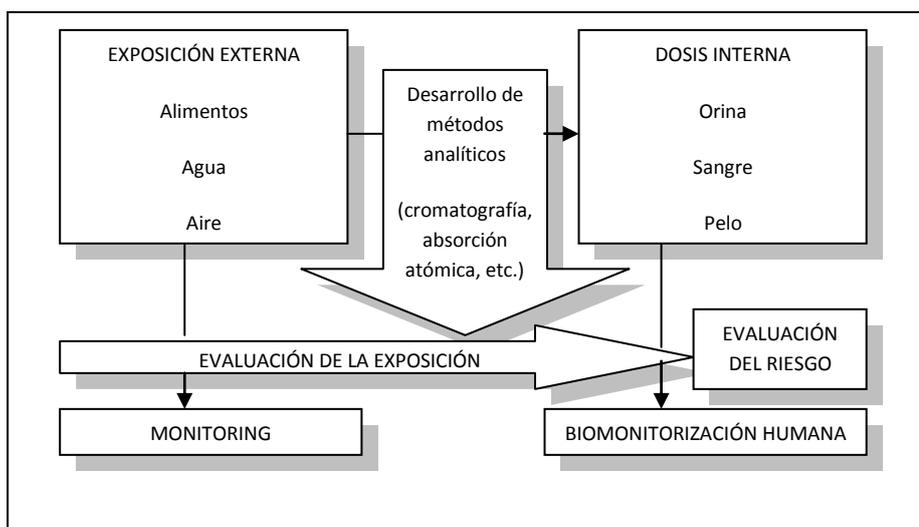


Figura 2.1. Esquema de la biovigilancia y su importancia en la Química Analítica [70]

Gracias a estos estudios se puede medir la concentración de multitud de sustancias a través del análisis en fluidos o tejidos humanos como la sangre, el cabello o la orina. Por otro lado, considera las rutas de exposición así como todas las fuentes que pueden suponer un riesgo, estudiando con ello las posibles rutas metabólicas y toxicológicas de las sustancias que pueden ser susceptibles de provocar un riesgo.

Los datos así obtenidos proporcionan una medida integrada de la exposición de la población procedente del conjunto de todas las fuentes de contaminación y tiene en cuenta todas las rutas de exposición y entrada al organismo (inhalación, ingestión, absorción dérmica). Es indispensable seleccionar correctamente la matriz biológica, los biomarcadores más adecuados para cada tipo de sustancia estudiada, así como de disponer de métodos

analíticos fiables y sensibles, aplicados bajo estrictos protocolos de calidad disponiendo además de referencias para la interpretación de los correctos resultados [5].

De esta forma, identificando y cuantificando el grado de exposición al riesgo concreto, se pueden llegar a tomar medidas y decisiones que reduzcan el contacto con este tipo de sustancias, minimizando sus consecuencias perjudiciales y sus posibles efectos nocivos para la salud.

2.1.1. Matrices biológicas

Las matrices biológicas consideradas deben ser fácilmente accesibles y en cantidad suficiente para realizar los análisis y por supuesto, sin suponer un riesgo para la salud de los individuos, es decir, intentar que la toma de muestra sea lo menos invasiva posible. En los estudios de HBM se emplean principalmente como matrices biológicas la orina y la sangre. Muchas sustancias lipofílicas persisten en la sangre, tanto en el suero como en el plasma. La sangre está en contacto con todos los tejidos, lo que permite determinar la presencia de contaminantes en este medio manteniendo una muy buena correlación entre los niveles observados y su exposición. Sin embargo, la recogida de esta matriz es invasiva por lo que puede condicionar la participación de voluntarios en el estudio. Además, se necesita personal especializado para su recogida, siendo una matriz compleja en el que los bajos niveles pueden necesitar un esfuerzo de metodología analítica adicional.

La orina permite el análisis de contaminantes hidrofílicos que se excretan y pueden ser recogidos fácilmente de manera no invasiva, además se pueden recoger volúmenes mayores de muestra.

Otras matrices como la leche materna, la saliva, el pelo o las uñas han sido propuestas con nuevas metodologías para relacionar las concentraciones dispuestas con la exposición recibida. La aplicabilidad de estas matrices está más limitada, ya que no existen

procedimientos estándares que hayan sido evaluados y publicados hasta el momento, no estando definidos los valores límites de interpretación de los resultados obtenidos [71].

La determinación de sustancias químicas en fluidos humanos comenzó a utilizarse en medicina ocupacional para la protección de la salud de los trabajadores expuestos. Entre los primeros estudios cabe citar la determinación de plomo en 1933 [72] o la de los metabolitos del benceno en 1936 [73]. Esto generó un problema analítico, ya que las bajas concentraciones en sangre y orina de las sustancias buscadas requerían técnicas cuyos límites de detección estuvieran acordes a los niveles buscados.

2.1.2. Elección del biomarcador

Otro aspecto del que debe encargarse la HBM es la elección del biomarcador más adecuado a cada sustancia en estudio. Deber ser el elemento representativo del grupo general, presentando una correlación directa entre la exposición que se pretende evaluar y su concentración. Del biomarcador va a depender el diseño de la metodología analítica e interpretación de los resultados. Ha de ser lo más representativo y específico posible de la sustancia inicial, siendo sus niveles en la matriz de estudio detectables con un resultado fiable y adecuado a los niveles de corte buscados.

En la actualidad, entre los analitos de interés en los estudios de biovigilancia destacan los metales (As, Cd, Hg, Pb), plaguicidas, los retardantes de fuego bromados, los ftalatos, compuestos perfluorados, los fenoles o los HAPs.

El control de la exposición de los HAPs se realiza básicamente en orina mediante el control de los metabolitos hidroxilados que se eliminan en unos pocos días tras la exposición en su forma libre [33]. De una manera fiable y específica se han determinado en orina el 1OHPyr, hidroxifenantrenos (OHPhe) o el 1,2-hidroxinaftaleno, entre otros. La determinación del 3-hidroxibenzo[a]pireno (3OHB[a]Pyr) en orina es un gran progreso ya que esta sustancia

presenta un alto grado de potencial carcinogénico, de ahí la importancia de su determinación. Sin embargo, no está claro que de momento, sea el biomarcador adecuado para los análisis de rutina [5, 33].

2.1.3. Bioindicadores de dosis biológica

Los bioindicadores de dosis biológica son los que indican la cantidad de sustancia que actúa sobre los sitios biológicos significativos, es decir, serán los parámetros que permitan evaluar la exposición y los efectos bioquímicos y biológicos de estas sustancias, una vez integrados al organismo.

Las sustancias mutagénicas o carcinogénicas se unen a las macromoléculas, especialmente proteínas, ARN o ADN. Esto es debido a que las sustancias electrofílicas reaccionan con los sitios nucleofílicos de dichas macromoléculas formando aductos. La unión entre este aducto con el ADN es una etapa crítica de la carcinogénesis química y la determinación de estos compuestos puede ser útil como bioindicador precoz para la determinación de cáncer [32]. Sin embargo, la determinación cuantitativa del aducto con ADN no es sencilla debido a las pequeñas concentraciones de estos compuestos, a la eficiencia de los mecanismos biológicos de reparación y a la dilución de los aductos debido a la división celular. Para este tipo de marcadores, se emplea la hemoglobina y la albúmina principalmente. La hemoglobina es una proteína utilizada en estas técnicas con una vida media de unos 120 días, pudiendo servir como indicador de exposición a agentes mutagénicos durante este período. El otro indicador empleado sería la albúmina, proteína sintetizada en el hígado con una vida media de unos 20-25 días y que sirve como transportadora de muchos compuestos lipofílicos [5].

2.1.4. Metodología analítica

Los métodos analíticos empleados deben ser elaborados y optimizados para determinar estas sustancias de una manera sensible y específica en las matrices biológicas complejas. Estos métodos deben ser desarrollados bajo condiciones de calidad asegurando la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Por otra parte, los estudios de biovigilancia o epidemiológicos llevan a cabo el análisis de numerosas muestras, por lo que la optimización de los recursos económicos, materiales y de personal debe tenerse muy en cuenta en la elección del procedimiento analítico y la instrumentación necesaria para ello.

La tendencia actual de la metodología analítica tiene en cuenta las limitaciones inherentes a las muestras presentadas en un estudio de biovigilancia. Es importante resaltar que las matrices biológicas presentan una elevada complejidad, no son fáciles de conseguir, estando disponibles en pequeña cantidad. Los analitos están presentes en dichas matrices a nivel de traza (ppb, ppt), mientras que el resto de componentes de la matriz puede interferir en el análisis.

Para llevar a cabo estos estudios se necesita metodología analítica sensible, con alta especificidad y selectividad, pudiendo asumir el análisis de un gran número de sustancias [68, 74].

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos métodos, entre los más recientes se encuentran las técnicas analíticas más avanzadas, como la espectrometría de emisión con fuente de plasma acoplada a la espectrometría de masas (IPC-MS) o la cromatografía de gases (GC), o líquidos (LC), acoplada a la espectrometría de masas en tándem (CG-MS/MS, LC-MS/MS) [75].

Los métodos analíticos tienden a ser multidimensionales para dar cabida al análisis de un gran número de componentes que deben ser analizados en estas matrices, necesitando

métodos rápidos y sensibles, empleando para ello la instrumentación adecuada. Para la detección y posterior cuantificación de los distintos analitos, la técnica HPLC (cromatografía de líquidos de alta eficacia) acoplada a MS es la más utilizada, aunque también se emplea la GC/MS, en muchas ocasiones precedida de una derivatización de las sustancias para modificar su volatilidad. La cromatografía provee de un gran poder de separación y resolución, lo que la hace ideal para el análisis de matrices complejas. El número de aplicaciones de esta técnica es muy numeroso. La cromatografía combinada con un detector de MS amplía la aplicabilidad mejorando la identificación de los compuestos [76].

Cada una de las etapas implicadas en el análisis (preparación de la muestra, análisis instrumental y tratamiento de los datos), es relevante para una correcta detección y cuantificación de los analitos y por tanto para la obtención de resultados fiables.

Una de las técnicas de extracción y purificación más utilizada es la extracción en fase sólida (SPE). La tendencia se centra en desarrollar nuevos métodos que permitan una elevada productividad, con una mayor automatización, empleando para ello soportes selectivos que permitan la inyección directa y repetida de las muestras biológicas [77].

La tendencia actual en el desarrollo de métodos analíticos será aquella que incida en la rápida preparación de la muestra con una mínima manipulación de la misma y con el menor uso de disolventes y menor cantidad de muestra posible, destacando aquellas en las que la preparación y limpieza se den en un solo paso. Por otra parte, la automatización de los procedimientos, así como la miniaturización del equipamiento utilizado, están en las líneas prioritarias de investigación en este terreno, haciendo análisis más rápidos, con menores costes económicos y resultando más cuidadosos con el medio ambiente [78, 79].

2.1.5. Valores de referencia

La importancia de los estudios de biovigilancia es esencial para evaluar y determinar los bioindicadores de exposición a los contaminantes ambientales más adecuados, obteniendo de ellos conclusiones y datos sobre niveles de población de referencia así como su tendencia en función de los diferentes factores de exposición, para así poder caracterizar la exposición de un determinado contaminante en una población particular. Estos estudios son muy heterogéneos en cuanto al contexto en el que se realizan, criterios de inclusión, condiciones de muestreo, tipos de compuestos analizados, unidades utilizadas para expresar la concentración, metodología analítica y límites de detección. Esto hace que sea difícil comparar niveles. La dificultad de brindar valores de referencia a las conclusiones extraídas de estos estudios hace introducir el término de niveles basales. Estos valores no representan valores toxicológicos, sino valores que habrá que tener en cuenta para minimizar los riesgos que estas concentraciones pueden tener sobre una determinada parte de la población. Es imprescindible para la correcta obtención e interpretación de los datos obtenidos, el conocimiento y la descripción meticulosa de todos los factores capaces de introducir variables tales como el tipo de población, su entorno o la metodología utilizada.

Estos valores permiten evaluar variaciones geográficas o tendencias temporales, determinar si los niveles de exposición son altos en grupos específicos, priorizar las investigaciones en los efectos sobre la salud humana, y evaluar la eficacia de las medidas programadas.

Por ejemplo, la composición de la mezcla de HAPs es distinta dependiendo del ambiente de trabajo donde se esté considerando el estudio o de si la población es fumadora o no. La cantidad de Pyr presente en las mezclas de hidrocarburos es relativamente constante, pero puede variar dependiendo del lugar de trabajo y del individuo, por lo que no se puede

establecer un límite de exposición para todas las industrias y para todos los trabajadores, ya que va a depender de diversos factores.

Lo que sí es constante es la cantidad de 1OHPyr excretado tras la exposición a los HAPs. Teniendo esto en cuenta, se establecen niveles basales del 1OHPyr excretado para distintos grupos de población. Por ejemplo, Jongeneelen et al [80], fijaron valores para una población no ocupacional en 0,24 $\mu\text{m}/\text{mol}$ en creatinina para no fumadores, subiendo este valor a 0,76 $\mu\text{m}/\text{mol}$ en creatinina en fumadores. El nivel más bajo encontrado en trabajadores se fija en 1,4 $\mu\text{m}/\text{mol}$ en creatinina, considerando éste como nivel no genotóxico. En trabajadores de horno de carbón y de producción de aluminio estos valores se encuentran entre 2,3–4,9 $\mu\text{m}/\text{mol}$ en creatinina.

2.1.6. Programas de HBM

Actualmente muchos gobiernos han implementado programas de HBM que evalúan los niveles de diferentes biomarcadores en la población.

Hasta la fecha se han dado a conocer tres informes realizados en EEUU por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), que coordinan los “Informes sobre Exposición Humana a Agentes Químicos Ambientales” sobre la exposición de la población estadounidense a ciertos compuestos químicos utilizando la biomonitorización. Estos informes se añaden a un amplio conjunto de estudios realizados en EEUU en décadas recientes; por ejemplo, la serie de las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (NHANES I, II y III). En muchos casos estos estudios han dado lugar a estudios de seguimiento (CDC, NHANES, HESI) [81-83].

En Alemania se han publicado tres informes, coordinados por la Agencia Federal Ambiental (1985/86, 1991/92 y 1998). El último es el de la Encuesta de Medio Ambiente Alemana (GerES III): “*Umwelt-Survey 1998, Band III: Human Biomonitoring*”, publicado en

2002. Contiene estudios representativos de la población general. Su propósito es determinar la exposición de la población alemana a contaminantes ambientales. El objetivo principal del Ger ES es generar, mantener al día y evaluar los datos representativos para facilitar la observación de la salud ambiental y mostrar la información en el ámbito nacional [84].

En Canadá destacan el Programa de Evaluación y Monitoreo del Ártico (AMAP) [85] y las Encuestas sobre Medidas de Salud Canadienses (CHMS) encargados de recoger información relevante para detectar enfermedades crónicas e infecciosas, nutrición y marcadores de entorno [86]. De igual forma, la función principal de AMAP es aconsejar en temas relacionados con la amenaza por la contaminación en el Ártico y, de este modo, estar en condiciones de promover políticas de prevención y vigilancia de la contaminación en la zona. Así, AMAP se encarga de medir y determinar los efectos de contaminantes de origen antropogénico en todos los compartimentos del Ártico, documentar las vías de entrada de dichos contaminantes, examinar su impacto y aconsejar a los países para la mejora de las condiciones de la zona.

Recientemente en España se han realizado varios proyectos con este fin. El proyecto DEMOSCOPHES (<http://www.eu-hbm.info/democophes>) y el proyecto BIOAMBIENT.ES El proyecto DEMOSCOPHES es un proyecto de investigación internacional del que España forma parte, que trata sobre el medio ambiente y la salud y que se está realizando con parejas de niños en edad escolar (entre 6 y 11 años) y sus respectivas madres, tanto en zona rural como urbana. En este proyecto se está evaluando la exposición a sustancias potencialmente tóxicas que están presentes en el medio ambiente. Las mediciones se realizan en orina y cabello. En las muestras de cabello se mide Hg y en la orina se mide cotinina (exposición al humo de tabaco), Cd (presente en pilas y tabaco), ftalatos y bisfenol A (compuestos plásticos). La realización de estos estudios a nivel europeo permitirá adquirir conocimientos sobre los impactos ambientales.

Desde el año 2007, el Centro Nacional de Sanidad Ambiental (Instituto de Salud Carlos III) responsable de DEMOCOPHES en España, desarrolla el proyecto BIOAMBIENT.ES. (<http://democophes.blogs.isciii.es/2012/04/04/bioambient-es/>).

BIOAMBIENT.ES es el primer proyecto a escala nacional cuyo muestreo cubre todas las áreas geográficas, sexo y sectores profesionales con el fin de obtener una muestra representativa de la población activa española. El reclutamiento de los participantes se llevó a cabo a través de los chequeos médicos ocupacionales anuales en varios Centros de Salud entre marzo de 2009 y julio de 2010. Constaba de un cuestionario epidemiológico para la adquisición de información socio-demográfica, medioambiental y exposición relacionada con el estilo de vida. Las matrices analizadas fueron orina y sangre para los distintos contaminantes. BIOAMBIENT.ES analizó los niveles de las siguientes sustancias: retardantes de llama bromados, cotinina, metales (Cd, Pb, Hg) [87], plaguicidas organoclorados, (PCB) y metabolitos de los HAPs [88].

Esta encuesta se realizó para generar valores de referencia de la exposición química (PCB, Pb, y Hg) y confirmó por ejemplo, altos niveles de mercurio atribuibles al consumo de pescado. Esta información puede ser utilizada para establecer valores de referencia y eventualmente para la evaluación de las deficiencias en las políticas medioambientales y de salud. Un folleto de información incluye niveles individuales de los resultados de cada participante, así como la información general de cada sustancia tóxica [89].

Dentro del programa BIOAMBIENT.ES se llevó a cabo el estudio "*Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENT.ES Project*" [90], que se encargó de los derivados hidroxilados de los HAPs. Los marcadores biológicos escogidos fueron el 1OHPyr, 1-2-,3-,4- y 9- OHPhe y el 3OHB[a]Pyr. Acorde con lo visto hasta el momento, el estudio encuentra una significativa influencia en el consumo del tabaco dentro de los niveles de HAPs detectados en orina, en el

uso de calefacciones domésticas y en el índice de masa corporal. La distribución geográfica también tiene una preponderancia, midiendo mayores niveles en el noroeste que en el sur o este de España, explicado por la diferencia de climatología y en la diferencia de hábitos alimenticios, alto consumo de dulces, legumbres y huevos, que parece ser, que están asociados a un elevado nivel de OHPhe en orina. Los valores de 1OHPyr medios se encontraban en el rango de 0,12-0,67 µg/g en creatinina.

La reciente implantación de los países europeos deriva de la necesidad de una estrategia europea sobre medio ambiente y salud, en la que se incentivan estos estudios, adoptando los programas de HBM como herramienta eficaz para calcular el riesgo. Así la HBM ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para la protección de la salud humana y la prevención de enfermedades ambientales, proporcionando una medida útil de la exposición a los contaminantes en el ser humano.

Se pretende con ello englobar a nivel europeo los estudios de HBM. Los objetivos de este proyecto piloto son establecer valores y rangos de referencia para la población general de diferentes agentes químicos, identificar variaciones geográficas en los niveles de exposición, determinar la prevalencia en la población de niveles por encima de los valores de referencia en la población o que puedan suponer riesgo para la salud, identificar subpoblaciones que presenten valores más altos, evaluar la efectividad de medidas de intervención desarrolladas para reducir la exposición de la población a agentes químicos específicos y establecer prioridades para la investigación de los efectos sobre la salud de determinadas sustancias.

La evaluación de la presencia de biomarcadores de exposición a contaminantes ambientales es esencial para poder tomar medidas en políticas de salud y medioambiente que ayuden a prevenir su exposición y posterior desarrollo de enfermedades derivadas de la exposición a estos contaminantes, desarrollando leyes encaminadas a la reducción de la contaminación por productos químicos.

2.1.7. Valores de referencia para los HAPs

Los HAPs son considerados por la IARC como carcinogénicos [14], por tanto, cualquier exposición a estas sustancias, debe ser evitado en la medida de lo posible. Los individuos que, debido a su trabajo, (plantas de coque, pavimentación de carreteras, impregnación de madera, fundición de aluminio) están en contacto directo con dichos productos, ven incrementada la posibilidad de sufrir efectos adversos sobre su salud, por lo que es importante determinar el grado de exposición que sufren a lo largo de su jornada laboral.

Se hace por tanto necesaria una legislación que marque límites asumibles de presencia de estos compuestos con evidentes propiedades genotóxicas y cancerígenas debido tanto a su ubicuidad en el medio ambiente como a su diversa exposición por las diferentes vías. Estas sustancias deben ser consideradas contaminantes emergentes prioritarios y su exposición debe ser controlada y mantenida a bajos niveles.

En el contexto de las legislaciones y agencias dedicadas a la protección de la salud y el medio ambiente, que rigen tanto la emisión como la presencia en alimentos, agua, aire y suelo, cabe destacar el Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004 sobre compuestos orgánicos persistentes (COPs) [91].

El Convenio de Estocolmo sobre COPs es un instrumento jurídicamente vinculante que establece la prohibición, restricciones de uso y las medidas a tomar para minimizar las emisiones (anexo III en el que están incluidos los HAPs).

Por otro lado los HAPs se encuentran sujetos a reducción de emisiones por el Reglamento 850/2004 donde se enumeran, de forma no exclusiva y como indicadores de esta familia, el B[a]Pyr, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno [1,2,3-c,d]pireno. Estos compuestos no tienen usos intencionales conocidos pero pueden ser productos intermedios y subproductos no intencionales en diversos procesos como: combustión, fabricación de

productos fitosanitarios o de uso industrial (pigmentos, colorantes, polímeros), negro de humo (usado como aditivo de carga, estabilizante o pigmento en polímero), componentes biocidas en el alquitrán (creosota) para la conservación de la madera o el asfalto. La ORDEN PRE/2666/2002 establece restricciones de comercialización y uso tanto de la creosota como para los productos que la contengan.

La información de la que se tiene conocimiento en este Convenio sobre emisiones de HAPs es abundante pero incompleta, ya que aporta poca información respecto a niveles de emisión, lo que hace imposible la comparación cuantitativa directa. Se necesitará, en un futuro, un consenso sobre cuál debe ser el indicador adecuado para referir las emisiones de HAPs y cuáles sus niveles. Lo que sí aporta son diversas medidas encaminadas a evitar las emisiones no intencionales de HAPs mediante la sustitución de los procesos que dan lugar a su formación. Entre estas medidas, por ejemplo, estaría la modificación de las instalaciones mejorando el sellado de puntos de emisión, emplazando adecuados sistemas de recogida de gases, tratamiento biológico de las aguas contaminadas o filtros, o la sustitución de las calefacciones por combustible de carbón y madera por calderas más modernas.

La EPA clasifica 16 de los HAPs como prioritarios y fija normas y criterios para la realización del muestro y métodos de análisis [6]. Estos son el naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, Pyr, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, B[a]Pyr, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, y el benzo[g,h,i]perileno. La EPA también determina como probables carcinógenos en seres humanos el B[a]A, el B[a]Pyr, el benzo[b]fluoranteo, el benzo[k]fluoranteno, el criseno, el dibenzo[a,h]antraceno y el indeno[1,2,3-c,d]pireno. Además incluye como no clasificables como carcinógenos en seres humanos los siguientes HAPs: acenaftileno, antraceno, benzo[g,h,i]perileno, fluoranteo, fluoreno, fenantreno y pireno. El acenafteno no ha sido clasificado según sus efectos cancerígenos.

La EPA ha indicado que no es probable que la ingestión o absorción diaria de las siguientes cantidades cause efectos dañinos en la salud: 0,06 mg de acenafteno, 0,04 mg de fluoranteo, 0,04 mg de fluoreno y 0,03 mg por kg de peso corporal de una persona adulta. El nivel real de exposición se presenta por la inhalación activa o pasiva de los compuestos presentes en el humo de tabaco, el producido al quemar madera y en el aire contaminado. Puede presentarse por contacto con la piel con el agua, hollín, alquitrán y suelos contaminados. Se ha calculado que la exposición total en la población de EEUU sea de 3 mg por día.

Por lo tanto, el gobierno de EEUU ha establecido normas y guías regulatorias para proteger a las personas contra los posibles efectos de salud causados por los HAPs.

Por citar algunos valores de referencia, por ejemplo, en el aire de áreas rurales los niveles oscilan entre los 0,02-1,2 ng/m³, mientras que en áreas urbanas éstos niveles oscilan entre los 0,15-19,3 ng/m³. Los niveles de referencia de HAPs en agua potable oscilan entre los 4 y 24 ng/L. El nivel en la dieta típica de EEUU es menor de 2 µg/kg HAPs en alimentos.

El Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) de EEUU, estableció un límite de exposición ocupacional recomendado y un promedio ponderado de tiempo para los productos de alquitrán de hulla de 0,1 mg de HAPs por metro cúbico de aire en una jornada laboral de 10 horas, durante una semana de trabajo de 40 horas.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) señala el tabaco como la primera causa mundial de muerte por cáncer y dedica una monografía a los HAPs. Añade 17 HAPs más a la lista de la EPA, haciendo un total de 33 HAPs prioritarios, estos son: antranteno, benzo[*l*]fluoranteno, benzo[*g,h,i*]fluoranteno, benzo[*a*]fluoreno, benzo[*b*]fluoreno, benzo[*c*]fenantreno, benzo[*e*]pireno, coronene, ciclopenta[*cd*]pireno, dibenzo[*a,h*]antraceno, dibenzo[*a,e*]pireno, dibenzo[*a,h*]pireno, dibenzo[*a,i*]pireno, dibenzo[*a,l*]pireno, 5-metilcriseno, 1-metifenantreno y perileno [37].

Por su parte, la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), agencia estadounidense responsable de prevenir o reducir los efectos nocivos de la exposición a sustancias peligrosas para la salud y calidad de la vida humana [25], elabora una lista de 17 compuestos del grupo de los HAPs en función de 4 factores: el volumen de información existente sobre ellos, su mayor toxicidad, mayor riesgo de exposición y mayores concentraciones encontradas en los lugares señalados como especialmente contaminados. Estos 17 compuestos coinciden con los 16 de la EPA exceptuando el naftaleno e incluyendo por el contrario el benzo[e]pireno y el benzo[j]fluoranteno.

A nivel Europeo, la regulación de la presencia de HAPs en el aire comienza a ser considerada por la Comunidad Europea (CE) en la Directiva 96/62/CE del Consejo del 27 de Septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente. En esta directiva se exige a la Comisión de la Unión Europea la presentación de propuestas de regulación de una serie de contaminantes, incluidos los HAPs, debido a su potencial cancerígeno.

La Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 15 de Diciembre de 2004 relativa al As, Cd, Hg, Ni y HAPs en el aire, establece una concentración máxima de B[a]Pyr de 1 ng/m^3 , y señala al B[a]Pyr como indicador de la actividad cancerígena del grupo. Además, los estados miembros deben controlar otros HAPs relevantes para evaluar la contribución total. Se establecen también criterios de muestro y métodos de análisis [92]. Esta Directiva está adaptada al Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire [93].

La Directiva 80/778/CEE del Consejo del 15 de julio de 1980 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano establece un valor máximo de $0,2 \text{ } \mu\text{g/L}$ de HAPs, tomando como sustancias de referencia el fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, B[a]Pyr, benzo[g,h,i]perileno e indeno [1,2,3,c-d]pireno.

En España, el Real Decreto R.D. 1138/1990 del 14 de Septiembre aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de aguas potables de consumo público adoptando el mismo valor límite que en la directiva 80/778/CEE.

La Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de Noviembre de 1998 sobre la calidad de aguas destinadas al consumo humano actualiza el criterio estableciendo un nivel máximo de 0,1 µg/L de HAPs entendidos como la suma de benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno, y un valor más restrictivo de 0,01 µg/L para el B[a]Pyr.

La legislación establecida por el Reglamento (UE) 835/2011, en lo que respecta al contenido máximo de HAPs en los productos alimenticios, concretamente fija como marcador de los HAPs al B[a]Pyr junto al B[a]A, benzo[b]fluoranteo y criseno. Este sistema garantiza el mantenimiento de los contenidos de HAPs en alimentos a niveles que no conlleven riesgos para la salud. Los niveles referidos al B[a]Pyr pueden consultarse en la Tabla 2.1 [94].

Tabla 2.1. Contenido de Benzo[a]pireno en alimentos

Producto alimenticio	Contenido máximo (µg/kg) peso fresco
Aceites y grasas	2
Carnes ahumadas y productos cárnicos ahumados	5.0
Carne de pescado ahumado y productos pesqueros ahumados	5
Carne de pescado no ahumada	2
Crustáceos y cefalópodos no ahumados	5
Moluscos bivalvos	10

Producto alimenticio	Contenido máximo (µg/kg)
peso fresco	
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	1
Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	1
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	1

Especial mención tiene el aceite de orujo debido a la alarma social desencadenada por una partida retirada de aceite por el Ministerio de Sanidad en Julio de 2001 debido a la presencia de B[a]Pyr en concentraciones elevadas. En el BOE 178 del 26 de julio de 2001 se establecen límites de determinados HAPs en el aceite de orujo de oliva. El máximo tolerable establecido es de 2 ng/g para cada uno de los siguientes compuestos: B[a]A, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, B[a]Pyr, benzo[e]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno. En cualquier caso, la suma de las concentraciones de todos ellos no puede superar los 5 ng/g.

En cuanto a la exposición laboral, en España, el Real Decreto 665/1997 de 12 de Mayo sobre la protección de los trabajadores, controla los riesgos asociados a la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo y establece una serie de normas y medidas de seguridad e higiene para prevenir la exposición laboral de los trabajadores a una serie de sustancias entre las cuales figuran los HAPs presentes en el hollín, alquitrán o la brea de hulla.

El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) realiza análisis de HAPs proponiendo diferentes métodos de análisis para su detección [95].

El Reglamento (UE) No 1272/2013 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas [96] considerando el B[a]Pyr, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y dibenzo[a,h]antraceno como carcinógenos restringiendo la cantidad de estos que puede encontrarse en partes de plástico y caucho de una gran cantidad de productos, que no se añaden intencionadamente pero que pueden pasar a formar parte del producto a través de impurezas o de las materias primas utilizadas en su producción, ya que pueden suponer un riesgo por inhalación, ingestión o adsorción cutánea. Los límites con respecto al contenido de HAPs en partes accesibles de plástico o caucho son de 1 mg/kg, estableciéndose un valor inferior a 0,5 mg/kg cuando estos productos formen parte de juguetes o artículos de puericultura. Este reglamento prevé una revisión de estos límites antes del 27 de diciembre de 2017 a la vista de los posibles nuevos datos científicos en los que se incluya la posibilidad de migración de los HAPs.

La PRTR o Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes, en su última revisión de octubre de 2013, fija normas y métodos estableciendo unos niveles umbrales de emisión en aire y agua [97]. Estos son: umbral de emisión a la atmosfera 50 Kg/año en agua y en suelo 5 kg/año. Estos valores están basados en el RD 508/2007 de emisión en estos medios.

Como puede verse, todavía hay mucho camino que recorrer, los límites de detección, los valores umbrales, y los estudios sobre repercusión tanto en el medio ambiente como en el ser humano distan mucho de estar solucionados. En muchos casos, los límites de detección suelen estar muy por debajo de las capacidades de detección de la instrumentación actual, por lo que el desarrollo de métodos alternativos permitiendo acceder a dichos niveles es uno de los campos de investigación más interesantes y actuales dentro de la Química Analítica.

2.2. EL 1-HIDROXIPIRENO COMO PRINCIPAL BIOMARCADOR

El Pyr es un hidrocarburo aromático policíclico formado por cuatro anillos conjugados que es rápidamente distribuido, metabolizado y eliminado como 1OHPyr en orina, representando una fracción constante, un 90% del total de Pyr excretado [90]. El 1OHPyr es un derivado hidroxilado del pireno, donde un grupo hidroxilo- sustituye uno de los carbonos de la estructura en la posición 1. Tiene una vida media de 4 a 35 horas decayendo su concentración a las 48 horas siguientes a la exposición. Por lo tanto, el 1OHPyr puede ser usado para evaluar la exposición reciente a HAPs [98]. La estructura química del 1OHPyr es la mostrada en la Figura 2.2 siguiente:

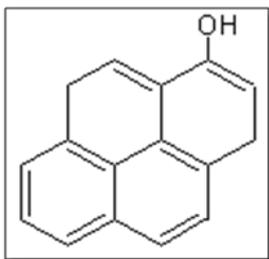


Figura 2.2. Estructura del 1-hidroxipireno

Desde 1985, el 1OHPyr es considerado un indicador representativo, sensible y fiable de la exposición de HAPs [99]. Es el metabolito empleado habitualmente en la determinación de dicha exposición ya que existe una relación directa entre la exposición industrial a los HAPs y la excreción urinaria del 1OHPyr. Los resultados demuestran que la concentración de pireno está estrechamente relacionada con la suma total de los HAPs [100]. El 1OHPyr ha sido, por tanto, considerado el mejor biomarcador, siendo objeto de numerosos estudios [33, 101-107].

Los HAPs no están presentes en el medio de forma individual, sino que forman una mezcla de hidrocarburos en diferente concentración. El pireno está presente de forma más o menos constante en las mezclas de estos compuestos y, siendo el 1OHPyr su principal y mayor metabolito, es lógico pensar que esta correlación directa haga que se pueda relacionar su

concentración con los niveles de exposición del grupo total de hidrocarburos, tomándose por tanto, su concentración como referencia.

Históricamente, el 1OHPyr se ha analizado en orina para cuantificar la exposición a los HAPs de los trabajadores industriales, debido al riesgo potencial que supone para la salud su presencia en el ambiente laboral. En 1987, Jongeneelen et al propusieron un método para determinar 1OHPyr en orina de trabajadores expuestos [108], que ha servido como base para posteriores estudios, tanto de biovigilancia como de análisis químico. Jongeneelen empleaba para la determinación del 1OHPyr un HPLC con detector de fluorescencia, consiguiendo unos niveles de concentración del orden de nmol/L.

El 1OHPyr ha servido desde entonces, para determinar HAPs entre otras matrices, en humo de tabaco [102, 109], en la dieta [110, 111] y en aire urbano [112]. Por ejemplo, el Pyr es uno de los productos mayoritarios en la emisión de HAPs derivados de la combustión del petróleo o el diesel, siendo una fuente principal de hidrocarburos en el medio urbano, por lo que su mayor metabolito se toma como representativo del total de los HAPs [105].

Sin tener un índice biológico de exposición establecido, el Comité de la Conferencia Americana de Higienitas Industriales de EEUU [113], recomienda que este valor no exceda de $0,49 \mu\text{mol 1OHPyr/mol}$ de creatinina, lo que sería igual a $0,95 \mu\text{g/g}$ de creatinina. Este valor está basado en los estudios de Jongeneelen publicados en 2004 [114].

Como indicador de dosis interna en población de no fumadores y no expuesta ocupacionalmente, la Comisión de Biomonitoring Humano de la Agencia Ambiental de Alemania Federal estableció un valor de referencia de $0,3 \mu\text{mol 1OHPyr/g}$ de creatinina [115].

Los valores de 1OHPyr en estudios de biomonitorización están expresados en $\mu\text{g 1OHPyr/g}$ de creatinina o $\mu\text{mol 1OHPyr/mol}$ de creatinina para corregir el efecto de la dilución de la orina [116]. Este valor representa la concentración de 1OHPyr respecto a la de creatinina en orina.

Para la evaluación de la exposición humana a estos compuestos, la biomotorización es un proceso esencial en el cual la preparación de muestra es uno de los pasos más importantes dentro del análisis. Es un paso previo que consume una gran cantidad de tiempo y donde es fundamental no añadir ninguna fuente de error.

Como se ha comentado anteriormente, el control de la exposición de los HAPs se realiza básicamente en orina mediante el control de los metabolitos hidroxilados. Se han empleado principalmente el 3-hidroxifluoranteno, 2-,3-,9- hidroxifluoreno [117-119], 1-,2-,3-,4-,9-hidroxifenantreno (OHPhe) [120-125], 1OHPyr, 3-OHB[a]Pyr, 1,2 hidroxinaftaleno [5] o el 3-hidroxi[a]pireno [108, 121, 126-130].

La Tabla 2.2 resume tanto los indicadores empleados como los métodos empleados para su determinación.

Tabla 2.2. Principales biomarcadores de HAPs

Biomarcador	Método de detección	Referencia bibliográfica
2-,3-,4 OHPhe	HPLC-FD CG-MS	[120-125]
3-hidroxifluoranteno	HPLC-FD SPE-CG-MS	[120, 124]
1-,9- OHPhe	HPLC-FD CG-MS	[120, 124]
1-,2-,3-,4-,9-hidroxifluoreno	SPME-GC-MS LC/MS/MS GC-MS	[117-120, 124]
3-hidroxi[a]pireno	HPLC-FD	[108, 121, 126-130]
3-hidroxibenzo[a]antraceno	HPLC-FD	[108, 121, 124, 128]

Refiriendo FD como Detector de Fluorescencia y SPME como Microextracción en Fase Sólida.

Los derivados hidroxilados del fenantreno también se presentan en una gran proporción en las mezclas de HAPs, y sus metabolitos aparecen de forma mayoritaria en la orina. El mayor problema al considerar los derivados OHPhe como biomarcadores, es que la separación cromatográfica es compleja. Estos compuestos eluyen conjuntamente dificultando la determinación de esta familia de manera individual, por lo que su análisis ha de hacerse considerando la coelución de los isómeros [120]. El análisis de los isómeros junto con el análisis del 1OHPyr puede dar una mayor información y precisión de la exposición a HAPs.

En la lista de los compuestos de la Tabla 2.2 se han incluido analitos con alto potencial carcinogénico, por lo que su manipulación ha de hacerse tomando ciertas precauciones y medidas de seguridad. Aunque trabajar con el 3-hidroxi[a]pireno o con el compuestos 3-hidroxibenzo[a]antraceno pueda dar una mayor idea de la dosis biológica y su asociación con la inducción de cáncer, no hay que olvidar el riesgo y precaución que se han de tomar en el manejo de esas sustancias.

El 1OHPyr es el indicador biológico más utilizado por varios motivos, el primero de ellos es que el contenido relativo de pireno, comparado con otros HAPs es constante [104], siendo el metabolito predominante. Éste puede ser detectado en una matriz no invasiva como es la orina, con gran sensibilidad. La conclusión del primer *workshop* sobre 1OHPyr en 1995 concluyó que era éste el mejor metabolito indicado para determinar la exposición ocupacional sobre HAPs [103]. Hay que añadir que se puede determinar a bajos niveles, y que la robustez de los métodos y su larga trayectoria hacen que sea el más utilizado en los análisis de rutina.

Por lo tanto, se puede concluir que la elección del 1OHPyr es adecuada para los análisis de rutina al no presenta características carcinogénicas, por lo que se disminuye el riesgo en la manipulación de la muestra. Es un analito sencillo y mayoritario que permite una gran

sensibilidad. La bibliografía es extensa, pudiendo encontrar gran información sobre su determinación y sus diferentes metodologías analíticas en diferentes matrices. El análisis de la muestra es sencillo, siendo por tanto un biomarcador idóneo para determinar los niveles de exposición de los HAPs de la población en general.

III. Fundamentos teóricos



3. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

3.1. CONCEPTOS GENERALES

La impresión molecular es una técnica consistente en la formación de un polímero que contiene grupos funcionales fijos predeterminados estequiométricamente, que pueden unirse de manera específica a una molécula plantilla. Al retirar dicha plantilla, los huecos formados, complementarios en tamaño, forma y orientación a esta molécula, quedan disponibles pudiéndose emplear como sitios de reconocimiento específico para la plantilla con la que fueron preparados. Los polímeros así formados se denominan polímeros de impresión molecular o MIP y representan una nueva clase de materiales diseñados como receptores estructurales[131].

Desde su descubrimiento debido a los trabajos de Wulff et al en 1972 [132], se han realizado numerosos estudios dando lugar a un gran número de publicaciones [27, 133-138]. Esto es debido a que los MIP son sencillos de preparar, no suponen grandes costes y presentan una alta afinidad y selectividad hacia el analito de interés, por lo que les hace muy adecuados para análisis de compuestos que se encuentren a baja concentración o en matrices complejas. Son además insolubles y muy estables tanto térmica como químicamente. Son muy versátiles, tanto en sus aplicaciones y número de analitos para los que pueden ser desarrollados, como en las diferentes presentaciones pudiendo ser preparados en distintos soportes (perlas, bloque, películas delgadas, membranas...), de acuerdo a las necesidades que proponga la aplicación [139-141].

Una de estas aplicaciones es su empleo como adsorbente selectivo en procesos de extracción en fase sólida para la limpieza y preconcentración de muestras [142-144], siendo esta una de las más importantes y la que mayor interés despierta dentro de la Química Analítica.

De igual forma, los MIP han sido ampliamente usados como biosensores o sensores químicos [145, 146], en catálisis [147], en electrocromatografía capilar (EC) [148] o como fase estacionaria en HPLC [149], lo que permite unificar las etapas de limpieza y detección de los analitos, disminuyendo considerablemente los tiempos de análisis.

3.2. SÍNTESIS

Para la síntesis del MIP se necesita básicamente un monómero funcional, un entrecruzante, el iniciador de la polimerización, el disolvente y el analito plantilla. De la elección adecuada de estos componentes va a depender la selectividad, constante de afinidad, capacidad y propiedades físicas del polímero. Con estos componentes, se va a formar una estructura polimérica, altamente entrecruzada, alrededor de la plantilla [137].

La síntesis consta de tres etapas. En la primera de ellas se pone en contacto el analito plantilla con el monómero funcional adecuado formándose un complejo de prepolimerización. Es importante destacar que las propiedades del polímero obtenido así como su estabilidad, dependen, en gran medida, del tipo de enlace formado entre este monómero y la plantilla.

La segunda etapa consiste en la polimerización propiamente dicha. La polimerización se induce añadiendo el entrecruzante, el iniciador y el disolvente o porógeno. Generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalico que puede ser inducido tanto térmica como fotoquímicamente.

Una vez formado el polímero, en la tercera etapa del proceso, se extrae el analito del interior de la estructura tridimensional constituida, liberando los sitios de reconocimiento específicos para ese analito. Estas cavidades creadas en la matriz polimérica, como se ha mencionado con anterioridad, serán complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito plantilla. De esta forma, el MIP formado será capaz de reconocer de forma

selectiva al analito para el cual se ha diseñado cuando vuelva a ponerse en contacto con él [150].

Se puede seguir el proceso a través de la Figura 3.1 que lo esquematiza [137].

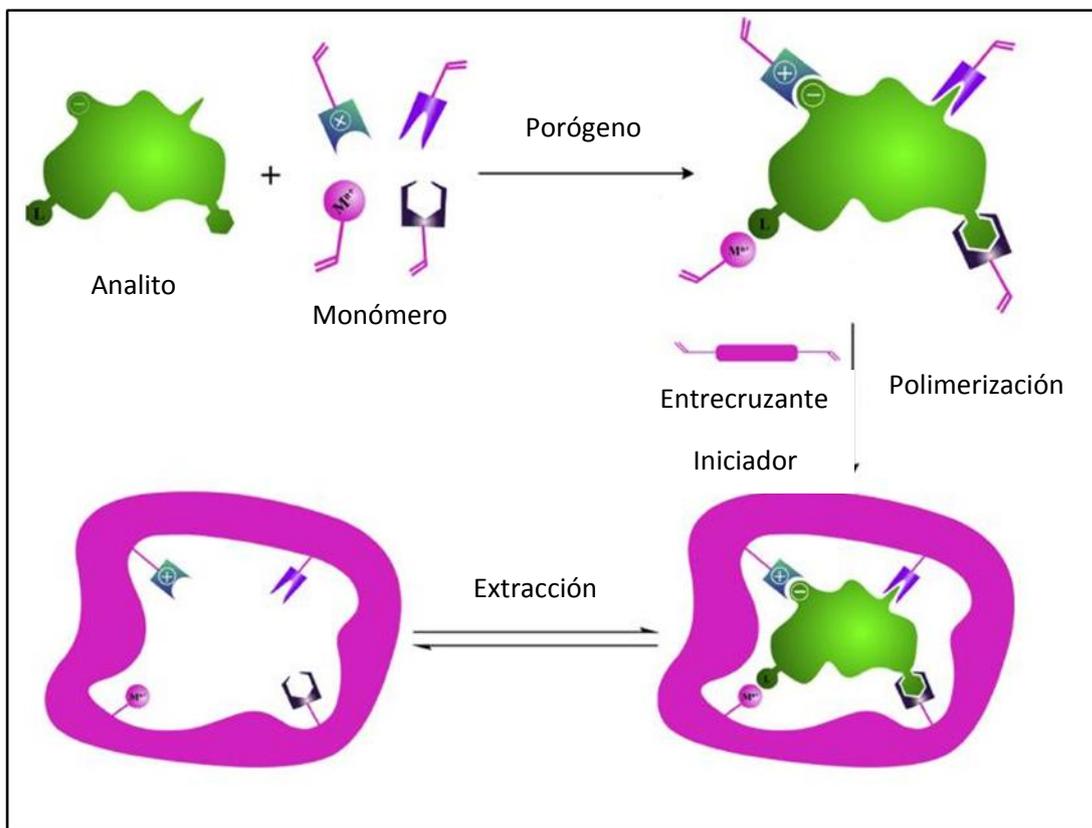


Figura 3.1. Esquema del proceso de formación del polímero de impresión molecular [137]

Por lo tanto, los componentes estructurales básicos con los cuales se forma el polímero son:

Molde o plantilla

Es el componente al que va dirigido la síntesis del polímero. El analito que va a servir como molde para la formación del MIP ha de presentar una serie de características que permitan interactuar con el monómero funcional generando un complejo estable durante la polimerización. Una de las características que debe tener una plantilla es la de no poseer grupos polarizables porque la polimerización suele darse por radicales libres. Por otra parte, no

debe presentar funcionalidad que inhiba la polimerización, además debe ser estable a la temperatura en la que se lleve a cabo el proceso.

Por lo general, los MIP son capaces de distinguir entre la molécula para la que fueron generados y moléculas muy parecidas estructural o conformacionalmente. Por este motivo, la forma y el tamaño de la plantilla van a tener posteriormente, una gran influencia en la selectividad del polímero.

Monómero funcional

La elección de un monómero adecuado se deberá realizar en función de las características de los grupos funcionales del analito. El monómero ha de contener en su estructura grupos funcionales que permitan la interacción con el analito plantilla, con suficiente fuerza como para poder formar un complejo que se mantenga estable durante la polimerización. El equilibrio de la reacción debe estar totalmente desplazado hacia la formación del complejo trabajando con una relación estequiométrica en exceso de monómero. Entre los más comúnmente utilizados en la síntesis no covalente destacan los monómeros representados en la Figura 3.2.

El ácido metacrílico (MAA) ha sido el monómero más empleado hasta la fecha, resultando apropiado para analitos que presentan grupos funcionales básicos en su estructura.

De igual forma, la vinilpiridina ha resultado muy adecuada para analitos que contengan grupos ácidos. En el caso de que la molécula molde fuera capaz de formar complejos con determinados iones, el empleo de monómeros funcionales quelantes como el vinil-imidazol sería el más conveniente [151].

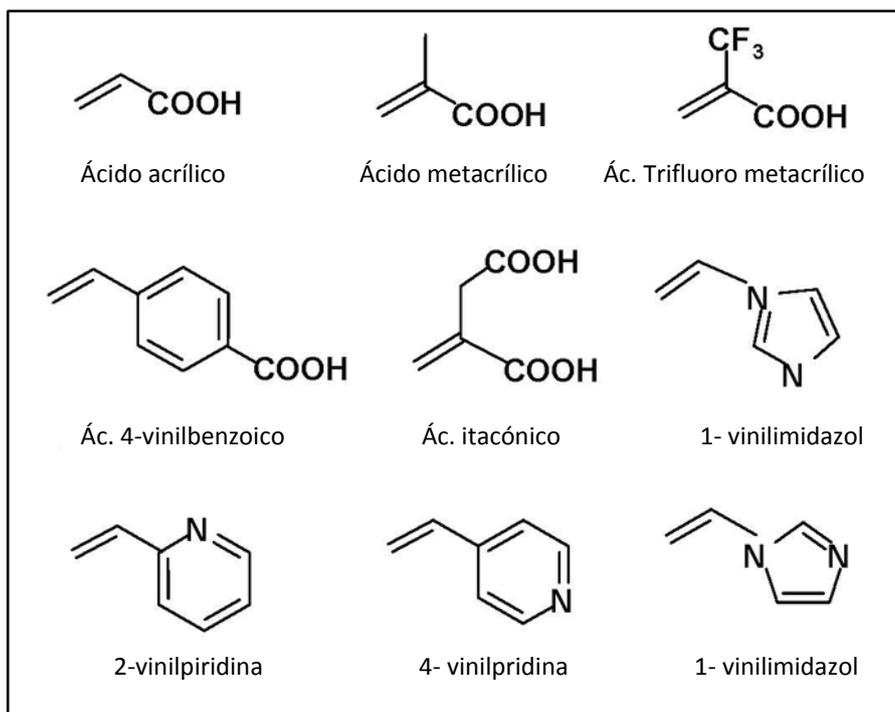


Figura 3.2. Principales monómeros funcionales empleados para la formación del MIP

Disolvente o porógeno

La naturaleza del disolvente va a influir en las interacciones entre el monómero funcional y la plantilla. Esto es así porque va a ejercer una influencia directa en la morfología final de la estructura, tanto en el tamaño como en la distribución de los poros y finalmente, con la estabilidad del polímero. Junto con el entrecruzante, van a determinar las propiedades físico-químicas del polímero formado, particularmente su porosidad, la cual debe permitir el acceso del analito a los sitios de unión generados, aunque puede variar en los tratamientos posteriores a la polimerización.

Las interacciones que se producen entre el monómero y la plantilla también van a estar muy influenciadas por el disolvente empleado. Por lo general, la estabilización de los enlaces por puentes de hidrógeno o por interacciones electroestáticas entre los monómeros y la plantilla se va a ver muy favorecida por el empleo de disolventes con una constante dieléctrica baja, es decir con disolventes apróticos como pueden ser el tolueno, cloroformo o

el ACN [152]. El uso de disolventes más polares, como pueden ser el agua o el metanol, en principio no es recomendable puesto que van a competir con el analito por la formación de puentes de hidrógeno con el monómero, interfiriendo significativamente en la formación de los enlaces con la plantilla, tendiendo a desestabilizar dichas uniones. Estos últimos suelen ser los más adecuados cuando la unión que interesa es de tipo hidrofóbico [153].

Monómero entrecruzante

La función del monómero entrecruzante es la de preservar la estabilidad estructural del polímero a lo largo del proceso de polimerización. Es el principal responsable de la morfología y porosidad de la matriz, siendo capaz de dar a la estructura su alto grado de entrecruzamiento y estabilidad con la finalidad de que se generen las cavidades complementarias en tamaño y forma al analito. De igual forma ha de estabilizar los sitios de unión selectiva confiriendo una gran estabilidad térmica y mecánica además de conseguir una buena transferencia de masa. Se suelen emplear los ácidos acrílico o metacrílico ya que dan una elevada especificidad [154].

La Figura 3.3 representa los entrecruzantes más comunes empleados en la síntesis de MIP.

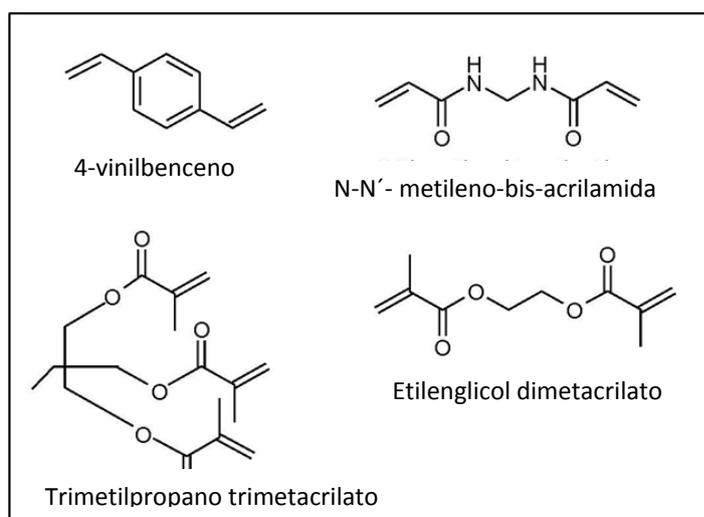


Figura 3.3. Entrecruzantes empleados en la síntesis de MIP

El etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) es el entrecruzante comúnmente empleado en combinación con el MAA, resultando muy adecuado ya que preserva los sitios de unión durante la polimerización, al mismo tiempo que confiere al polímero una gran estabilidad mecánica y térmica y buena mojabilidad, permitiendo una adecuada transferencia de masa. El trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) posee características similares al EGDMA [155].

Iniciador

Será el compuesto que marque el comienzo de la polimerización introduciendo radicales en el sistema. El método de iniciación puede llevarse a cabo a través de radiación ultravioleta o por la acción del calor, es decir, la polimerización se podrá iniciar vía fotoquímica o vía térmica, respectivamente, y la elección del iniciador vendrá dada por esta cuestión. Los iniciadores suelen ser de tipo azo, el más empleado es el 2-2-Azo(bis)isobutironitrilo (AIBN) que puede emplearse tanto por radiación ultravioleta como por acción del calor a temperaturas superiores a 60 °C. Por lo general, la polimerización se lleva a cabo durante 24 horas [156]. Cuando la molécula molde es térmicamente inestable, es posible generar radicales libres a baja temperatura por debajo de los 4 °C, mediante radiación UV empleando un fotoiniciador radicalario como, por ejemplo, la dimetoxifenil acetona [151].

Atendiendo a la naturaleza de la interacción entre el monómero funcional y la plantilla, los MIP se pueden clasificar en función del tipo de síntesis con la que se lleva a cabo, en polímeros covalentes, semi-covalentes y no covalentes. Esto es así porque de este tipo de interacción va a depender considerablemente las propiedades del polímero final obtenido [157].

3.2.1. Síntesis covalente

Este modelo de síntesis fue introducida en 1972 por Wulff y Sarchan [132] donde se presentaban los primeros ejemplos de impresión molecular con polímeros orgánicos

sintéticos. En este trabajo se describía la preparación de un polímero cuyas cavidades presentaban propiedades quirales que permitían la separación de especies en una mezcla racémica. En este caso la unión entre el monómero y el analito se realiza de forma covalente, tanto en su formación como en el reconocimiento posterior de los analitos permitiendo una gran definición estructural en la forma y el tamaño de la cavidad generadas. Requiere, por tanto, de la formación de enlaces covalentes reversibles entre los monómeros y la plantilla. Los monómeros funcionales suelen ser de tipo acrílico o vinílico. Después de la síntesis, la plantilla se extrae mediante rotura química de los enlaces covalentes, lo que suele realizarse mediante un proceso de hidrólisis [158].

Los MIP así formados son muy selectivos, produciéndose sitios de unión con una distribución de afinidad homogénea hacia la plantilla. Como la síntesis se ha llevado a cabo estequiométricamente con los monómeros funcionales, el porcentaje de unión específica es muy alto [157]. El inconveniente reside en el número de monómeros capaces de llevar a cabo un enlace covalente de naturaleza reversible con el analito, así como el impedimento estérico en la disposición espacial de los grupos funcionales. La mayor parte de los enlaces covalentes empleados en este tipo de polimerización son inestables en medio acuoso, lo que limita considerablemente los procedimientos de polimerización disponibles [159]. Debido a estas limitaciones, su aplicación analítica ha sido considerablemente escasa.

3.2.2. Síntesis semi-covalente

El procedimiento de síntesis semi-covalente fue propuesto por primera vez por Sellergren et al en 1990 [160], al que siguieron otros estudios como los llevados a cabo por el equipo de Whitcombe en 1995 [161]. En este caso, la interacción inicial es a través de un enlace covalente, pero el reconocimiento posterior que se lleva a cabo es de naturaleza no covalente. Sellergren sintetizó un polímero covalente a partir de la p-aminofenilalanina. Los restos de ácido carboxílico presentes en la matriz, formados tras la hidrólisis de la plantilla,

eran capaces de interactuar con el aminoácido plantilla mediante la formación de enlaces por puentes de hidrógeno.

De igual forma que en los casos anteriores, los MIP formados son muy selectivos aunque siguen estando limitados a determinados compuestos cuyas funcionalidades puedan adaptarse a ella.

3.2.3. Síntesis no covalente

Fue introducida en 1981 por Arshady y Mosbach [162]. En este trabajo se preparó un polímero empleando metacrilato de metilo como monómero funcional que, mediante fuerzas electroestáticas, formaba un compuesto de prepolimerización con la N,N'-fenildiacrilamida. En este caso y a diferencia de la síntesis covalente, el complejo formado entre la plantilla y el monómero funcional no se realiza a través de enlaces covalentes, sino que se forma mediante interacciones moleculares de carácter débil. La interacción monómero-analito se produce a través de puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas o fuerzas de Van der Waals para el reconocimiento de la plantilla. Una vez formado el complejo, la extracción de la plantilla se realiza con el disolvente adecuado, sin necesidad de llevar a cabo una hidrólisis como en el caso de la síntesis covalente.

En este procedimiento, la flexibilidad y sencillez de la síntesis hace que esta técnica pueda ser aplicada a un amplio rango de monómeros y analitos, siendo actualmente, la síntesis más empleada [163], aunque presenta la desventaja de ser menos selectiva y homogénea en los puntos de unión que la síntesis covalente.

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS

Muchos factores determinan la estructura y las propiedades de los sitios de reconocimiento así como la selectividad, afinidad, capacidad y propiedades del polímero. Todos ellos influyen en la extensión de la estructura tanto microscópica como macroscópica

[150]. Por tanto, entre los parámetros a optimizar en la síntesis de los MIP se encuentran: la naturaleza y cantidad de monómero, iniciador, entrecruzante y porógeno, la forma de iniciar la polimerización y la metodología empleada [152].

Debido al elevado número de variables que pueden influir en las características del polímero final obtenido, la optimización del proceso resulta compleja.

La plantilla es el componente fundamental dentro de la síntesis de MIP. Va a dirigir la organización de los grupos funcionales de los monómeros uniéndose a ellos.

Como se ha comentado, la polimerización suele darse por radicales libres, por lo que en estas condiciones no debe presentar funcionalidad que inhiba o retarde el proceso. Dependiendo de la elección de iniciación de la polimerización, debe ser estable a temperaturas superiores a 60 °C o a la radiación ultravioleta [154].

Una vez conocido el analito, es necesario seleccionar aquellos monómeros que mejor interaccionen con el mismo. Existen tres maneras de abordar este estudio. La primera, la química computacional. Esta metodología consiste en emplear programas de ordenador que calculan teóricamente las energías de unión entre dos moléculas. Estos cálculos son complejos y se basan en modelos teóricos ya establecidos. El segundo método sería a través del estudio de la resonancia magnética nuclear (RMN). El empleo de esta técnica también permite calcular las ya mencionadas interacciones pero de una manera experimental. El último método consistiría en fabricar polímeros con cada monómero y después evaluar su afinidad. A la hora de seleccionar el mejor monómero hay que tener en cuenta que tampoco interesan aquellos que presentan una fuerza de interacción excesivamente fuerte, ya que a pesar de la gran afinidad que tendría el material, sería muy complicado eliminar esta interacción. En este caso, la limpieza que hay que hacer una vez fabricado el MIP sería muy complicada [164].

Por tanto, la selección del monómero funcional más adecuado será función de las características y grupos funcionales del analito, empleado como molécula molde o plantilla, con el que habrá de formar un complejo de prepolimerización estable. Es deseable que además se formen interacciones complementarias aumentando con ello la afinidad y selectividad de las cavidades, ya que el monómero funcional es el responsable de las interacciones en los sitios de reconocimiento [165].

Además, en su elección habrá que tener en cuenta el tipo de síntesis que se quiere llevar a cabo. En la síntesis no covalente, el complejo formado por la plantilla y el monómero funcional se encuentra en equilibrio, pero los monómeros se encuentran en un exceso relativo respecto a los moles de la plantilla para desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo, por lo que se tiende a que la relación plantilla:monómero sea del orden 1:4 ó 1:6. Al tener un exceso de monómero funcional, se incrementa el número de grupos funcionales no específicos, pero una relación menor podría dar lugar a una menor densidad de los sitios de enlace [153, 166, 167].

La síntesis no covalente es más flexible en cuanto a la selección de los monómeros funcionalizados que complementen a los grupos funcionales de la plantilla. En algunos casos pueden combinarse distintos monómeros para incrementar las interacciones y mejorar la complementariedad de la plantilla proporcionando una mayor selectividad [168].

Los tipos de enlace que se forman en una y otra síntesis también difieren en sus características. Por ejemplo, los monómeros empleados en la síntesis de polímeros covalentes deben formar un compuesto covalente reversible con el analito, de manera que pueda romperse posteriormente. En este caso se suelen emplear los polímeros basados en derivados del ácido borónico en el que pueden formarse enlaces basados en la formación de ésteres de los ácidos borónicos [169].

Los enlaces formados en los polímeros no covalentes suelen emplear derivados de los ácidos carboxílicos. Estos son capaces de dimerizar en altas concentraciones de monómero en medio apolar pudiendo interactuar de múltiples maneras con una gran cantidad de analitos plantilla. El mecanismo propuesto consistiría en aprovechar su carácter tanto aceptor como dador de protones en la formación de puentes de hidrógeno, la formación de pares iónicos o la interacción a través de la formación de dipolo-dipolo [157]. En este caso el monómero más utilizado es el ácido metacrílico ya que presenta una buena rigidez en la rotación de los enlaces aumentando la estabilidad del complejo.

En el caso de que el analito plantilla sea de carácter ácido, el monómero básico más utilizado es la vinilpiridina, ya que presenta un anillo aromático pobre en electrones π . Los analitos aromáticos ricos en electrones dan lugar a la formación de interacciones tipo $\pi\cdot\pi^*$. [157].

Si la plantilla es de naturaleza neutra, se suele emplear la acrilamida como monómero funcional dando lugar a puentes de hidrógeno [170].

Por otra parte, el porógeno proporciona una única fase en la que se encuentran inmersos todos los componentes de la polimerización. Su principal función será además la de crear poros en el polímero. Si se varía la naturaleza y la proporción del disolvente, se puede llegar a controlar la morfología y el volumen del poro formado.

El porógeno se elige en función de su capacidad para estabilizar el complejo de prepolimerización formado entre el monómero funcional y la plantilla. La impresión covalente permite elegir entre una gran variedad de disolventes, en la no covalente hay que optimizar su elección teniendo en cuenta que éste debe maximizar la probabilidad de formación del complejo plantilla-monómero funcional. Por ejemplo, para estabilizar complejos basados en la formación de interacciones del tipo puentes de hidrógeno o fuerzas electroestáticas,

convendría elegir disolventes apolares apróticos. Si se utilizan interacciones hidrofóbicas, será preferible utilizar agua o mezclas acuosas [154].

La porosidad del polímero obtenido se puede modificar con la adición de una pequeña cantidad de isooctanol al porógeno. Esto es de utilidad cuando el polímero va a emplearse como fase estacionaria en técnicas de separación como electrocromatografía capilar [171].

Hay que tener en cuenta que para obtener un polímero poroso de alta estabilidad mecánica, el monómero debe encontrarse en gran proporción ya que se requiere de un grado de entrecruzamiento mayor del 80 %. Además, la reactividad del entrecruzante debe ser similar al monómero funcional para evitar la polimerización predominante de uno sobre otro. Esto se ha evitado en algunos estudios cuando el entrecruzante utilizado ha actuado como monómero funcional y como entrecruzante [172].

Se suele emplear la molécula EGDMA. Su disposición hace que se formen enlaces cortos pero flexibles entre dos de las unidades polimerizables, favoreciendo la reproducción flexible de la forma de la molécula molde [150].

Por otro lado, el iniciador será el responsable del inicio de la reacción. Su elección dependerá tanto del método elegido para iniciar la polimerización, es decir, mediante radiación ultravioleta o iniciación térmica, como de la temperatura a la que se lleve a cabo si dicha iniciación se lleva a cabo por acción del calor.

Entre los parámetros a optimizar se encuentran la concentración de iniciador (normalmente suele estar entre 1-2% en peso del total de los monómeros), la temperatura y el tiempo de formación del polímero. La temperatura será función de la estabilidad térmica del iniciador que debe fragmentarse para que dé lugar a la polimerización [156].

Se suele emplear el AIBN, ya que permite que la reacción se desarrolle rápidamente, llevándose a cabo tanto por la acción de radiación ultravioleta, como por el calor en condiciones suaves, temperaturas superiores a 60 °C y presión atmosférica [156].

3.4. MÉTODOS DE POLIMERIZACIÓN

Dependiendo de la metodología que se emplee en la formación del polímero se obtendrán distintas morfologías que dependerán de la aplicación a la que vaya destinado el polímero.

3.4.1. Polimerización en bloque

El proceso de polimerización más ampliamente utilizado es la polimerización en bloque. Fue el primer método que se empleó [173, 174]. Sigue un procedimiento muy sencillo basado en la polimerización radicalica de una disolución concentrada de monómeros en el cual todos los componentes se mezclan dando como resultado un monolito (bloque) de polímero de forma idéntica al recipiente empleado en el que se ha llevado a cabo la polimerización. Concluido el proceso, el recipiente se rompe para recuperar el analito. Posteriormente, es necesario triturarlo y tamizarlo hasta obtener el tamaño deseado dando como resultado partículas amorfas. El analito plantilla se elimina posteriormente, liberando las cavidades responsables del reconocimiento selectivo del analito. Por ejemplo, tamaños de partícula empleados para cromatografía suelen ser de 25-38 μm y para la extracción en fase sólida se suele emplear un tamaño de entre 50-200 μm [175].

Es el tipo de polimerización más sencillo y más barato, sin embargo, presenta varios inconvenientes [176] tales como la necesidad de triturar y tamizar el polímero obtenido, lo que hace que las partículas creadas no sean homogéneas ni en tamaño ni en forma, con la consiguiente manipulación y pérdida de rendimiento al destruir parte de los sitios de reconocimiento molecular. Además, una parte de los sitios específicos generados se destruyen

en el proceso de trituración. La irregularidad de las partículas también es un inconveniente ya que disminuye la capacidad de carga, haciendo que la distribución de los sitios sea muy heterogénea.

Todo ello hace que, tras el proceso completo, la cantidad de polímero que puede ser usado con fines analíticos se reduzca considerablemente respecto al producto inicial, lo que conlleva una pérdida importante de la capacidad de carga del polímero. Las partículas obtenidas mediante el proceso de polimerización en bloque resultan apropiadas para SPE habiéndose empleado en multitud de procesos [177-179]. Además, tras varios tratamientos, pueden ser empaquetadas en una columna cromatográfica.

3.4.2. Polimerización por precipitación

En este caso, se trabaja en exceso de disolvente, por lo que las cadenas poliméricas no ocupan el volumen del disolvente, encontrándose la mezcla de reactivos mucho más diluida [180]. Se añade al procedimiento agitación durante el proceso de polimerización, obteniéndose partículas más pequeñas, tanto menores cuanto menor sea la velocidad de agitación. Esta dispersión da como resultado la creación de partículas esféricas individuales en el seno del polímero. La rigidez y entrecruzamiento de las partículas formadas es suficiente para la formación del polímero [181].

Con este tipo de polimerización lo que se obtienen, por tanto, son partículas independientes, esféricas y mucho más homogéneas, con mayor capacidad y mejor distribución de los sitios de unión que las conseguidas por la anterior técnica. Se elimina además la etapa de trituración y tamizado del polímero con lo que las pérdidas y manipulación del polímero se minimizan en esta etapa mejorando el rendimiento de polimerización [182]. Como principal desventaja figura el tamaño de partícula, ya que mediante este proceso el tamaño es del orden de 1-3 μm , lo que provoca sobrepresión cuando se emplean como fase

estacionaria. Otro inconveniente es establecer unas reglas generales que permitan la obtención de partículas con un tamaño concreto.

Es una técnica sencilla que ha favorecido su aplicación en el desarrollo de sensores [183] o fases estacionarias en técnicas de separación [184].

3.4.3. Polimerización en suspensión

En este caso se combinan dos fases, una orgánica hidrofóbica, en la que suele emplearse líquidos perfluorados con la mezcla de polimerización, y otra fase dispersante orgánica inmiscible con la anterior. Se emplean líquidos perfluorados porque la fase acuosa puede impedir la interacción entre el analito y el monómero. La mezcla se agita, polimerizando en forma de gotas en suspensión que son estabilizadas por agentes surfactantes [185]. Estos serán los encargados de controlar el tamaño de partícula junto con la agitación, lo cual es una ventaja respecto al anterior [186]. Es un método rápido aunque se encarece con el uso de los compuestos perfluorados [187].

3.4.4. Polimerización en dos etapas

Técnica propuesta inicialmente por Hosoya et al en 1994 [188]. Para este tipo de polimerización se sintetizan partículas esféricas de látex en medio acuoso que posteriormente se hinchan al formar microemulsiones tras adicionar un agente plastificante. Estas partículas se impregnan con la mezcla de prepolimerización de tal forma que en su superficie se forme una capa de polímero. Es un método más complejo, no indicado en la síntesis no covalente.

3.4.5. Técnicas de injerto

En esta técnica se emplean partículas [189] o membranas [190] como soporte de polimerización. La polimerización se pueden llevar a cabo bien sobre una superficie inmovilizada donde se encuentra el polímero junto con la mezcla de polimerización para

posteriormente llevarse a cabo [191], o bien el compuesto inmovilizado sobre la superficie es el iniciador, permitiendo que el crecimiento de las cadenas poliméricas vaya desde la superficie controlando el grosor de la capa. Esta técnica es una de las tendencias actuales en las técnicas de polimerización, al permitir que estos polímeros funcionalizados puedan aplicarse a un mayor número de analitos.

3.5. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS MIP

Debido a su elevada estabilidad mecánica y térmica y a sus propiedades de reconocimiento molecular, los MIP pueden ser empleados en una amplia variedad de aplicaciones [192].

Entre las más importantes destacan su uso como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida (SPE) [193], como fase estacionaria en cromatografía (HPLC) [194], como fases estacionarias de columnas capilares en electrocromatografía capilar (EC) [195] o como reconocimiento selectivo de sensores [196].

3.5.1. Preparación de muestra

La tendencia actual dentro de la preparación de muestra pasa por una etapa de creciente interés por la miniaturización, facilidad en las operaciones, automatización y búsqueda del menor consumo de disolventes posible. Técnicas como la SPE, SPME o la extracción con barras agitadoras permiten mejoras en la preparación de muestras. La selectividad de todas estas técnicas puede ser mejorada empleando material selectivo para el analito que se pretende determinar.

Los MIP son buenos candidatos como adsorbentes para la preparación de muestra, debido a su alta selectividad y habilidad para preconcentrar analitos en muestras complejas. En este sentido, la aplicación que ha adquirido mayor importancia es la extracción en fase sólida o SPE.

Extracción en fase sólida (SPE)

Los MIP pueden ser empleados como nuevos materiales adsorbente selectivos para procesos de extracción en fase sólida. Comparados con los adsorbentes tradicionales, no sólo concentran, sino que aíslan el analito de las matrices en las que se encuentran, siendo de gran importancia en muestras complejas. Consecuentemente, los MIP son uno de los adsorbentes más efectivos que se han empleado para el tratamiento de numerosos analitos en alimentos, pesticidas, agua, fluidos biológicos, drogas, muestras medioambientales o medicamentos [142, 197-202].

El empleo de MIP como adsorbente selectivo en SPE o MISPE (Extracción en fase sólida basada en polímeros de impresión molecular), fue iniciado en 1994 por Sellergen para el análisis de pentamidina en orina [203]. MISPE es la técnica más importante a la que puede acoplarse el uso de los MIP. Algunas compañías comercializan cartuchos empaquetados con polímeros impresos para la determinación de diferentes analitos en distintas muestras. Así mismo, hay numerosas investigaciones publicadas que describen la síntesis y el empleo de MIP para SPE [135, 199, 204, 205]. Esta surge de la necesidad analítica de análisis más rápidos, con métodos simples de preparación donde la extracción, concentración y limpieza de la muestra se desarrollan en una misma etapa. El protocolo es similar a otras técnicas con adsorbentes convencionales.

El procedimiento consiste en empaquetar el MIP en un cartucho de extracción en fase sólida (SPE), donde posteriormente se retiene el analito de interés percolando un volumen conocido a través de un adsorbente sólido (en un cartucho, columna o disco), bajo condiciones cuidadosamente controladas que favorecen la absorción preferencial del analito sobre los componentes de la matriz. El analito es recuperado del adsorbente, extrayéndolo en un pequeño volumen de disolvente o de una mezcla de solventes apropiada. En este proceso, la

muestra se preconcentra y limpia quedando preparada para poder ser detectar por las diferentes técnicas analíticas.

Dependiendo de cómo se lleve a cabo la extracción en fase sólida combinada con el uso de MIP (MISPE), se pueden distinguir:

MISPE *on line*: los sistemas de detección tales como el GC, HPLC, o de diodos en serie (DAD), se acoplan al MISPE consiguiendo automatizar los procesos. Esta metodología fue introducida por primera vez por Masqué et al en el año 2000 acoplado un MISPE a un HPLC para determinar 4-nitrofenol de una mezcla de agua de río [206]. No son demasiados los trabajos encontrados en bibliografía con este protocolo debido a la dificultad para combinar la fase móvil requerida para llevar a cabo la separación analítica con el disolvente adecuado para eluir los analitos retenidos. Con este método se reduce la manipulación de la muestra, minimizando las pérdidas y contaminación del analito, pudiéndose mejorar los límites de detección y reproducibilidad del método [137].

En el modo *off line*, una pequeña cantidad de polímero es empaquetada dentro de un cartucho de polietileno entre dos fritas para evitar pérdidas. A continuación se acondiciona el cartucho y se lleva a cabo la carga de la muestra cuyo analito quedará retenido en el MIP. De esta forma los analitos son concentrados y purificados. Posteriormente, se lleva a cabo la etapa de limpieza para eliminar las posibles interferencias presentes en la muestra. Finalmente se procede a la elución de los analitos en aquellos disolventes que permitan una recuperación cuantitativa del analito. Recogido el eluato junto con el analito ya extraído, puede llevarse a cabo su determinación analítica, empleando la técnica instrumental requerida en cada caso.

De esta forma se preconcentran los analitos de interés sobre todo cuando estos se encuentran a bajos niveles de concentración, nivel traza, o bien cuando la matriz es compleja, aportando con ello una gran selectividad.

Microextracción en fase sólida (SPME)

Desarrollada en 1989 por Arthur y Pawliszyn [207], se basa en el reparto de los analitos entre la muestra y la fase estacionaria, que en este caso recubre la superficie de una fibra normalmente de sílice fundida. Los analitos son desorbidos térmicamente en el puerto de inyección de un GC o llevando a cabo la elución de los analitos en el disolvente adecuado para posteriormente ser analizados mediante otras técnicas cromatográficas, como HPLC, MS o CE.

La fibra de la que está constituida la fase estacionaria no es selectiva, por lo que en el proceso de extracción se puede dar una falta de selectividad. Es por ello que la combinación de los MIP como fase estacionaria, ha supuesto un amplio avance mejorando la simplicidad, flexibilidad y selectividad de este tipo de técnica. Fue introducida por primera vez para la determinación selectiva de propanolol en muestras de suero [208]. Su mayor ventaja es la miniaturización y automatización del proceso, ya que se integra en un solo paso la extracción, concentración e inyección de la muestra. El volumen de adsorbente es mucho más pequeño que el empleado en SPE.

Entre sus inconvenientes se destacan la complejidad de la instrumentación y la necesidad de compatibilizar el disolvente necesario para la desorción y la fase móvil empleada en la separación.

Barras de agitación magnética (SBSE)

La polimerización se lleva a cabo sobre unas barras de agitación magnética. Está basado en el reparto de los analitos entre la muestra en estado líquido y una fase estacionaria que recubre dicha barra. Estas barras comercialmente suelen estar cubiertas de polidimetilsiloxano (PDMS) restringiendo el rango de aplicación a compuestos hidrofóbicos debido al carácter apolar del PDMS. Para mejorar la selectividad de estas barras agitadoras se han desarrollado MIP en forma de película que recubren dichas barras. De esta forma se

aumenta la selectividad además de presentar un rápido equilibrio de adsorción debido a la naturaleza porosa del MIP [209].

MIP en perlas magnéticas

Este proceso de síntesis fue desarrollado por Li et al en 2009 [210]. Mediante este método sintetizaron un MIP en perlas magnéticas para la molécula de atracina. El tiempo de polimerización fue muy corto comparado con las otras técnicas ya que se llevó a cabo mediante microondas y permitió la síntesis de polímeros con capacidad de reconocimiento molecular, capaces de ser eliminados de la disolución mediante la aplicación de un campo eléctrico, evitando con ello el paso de eliminarlos filtrando o centrifugando la muestra.

Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)

La MSPD se basa en la completa disrupción de la muestra que permite a los componentes dispersarse dentro del adsorbente sólido. La muestra es dispuesta en un mortero y se disgrega con el sorbente hasta la completa disrupción y dispersión de la misma. La mezcla se empaqueta en un cartucho de SPE eluyendo los analitos con los disolventes adecuados para eliminar interferentes [211]. Es una técnica de una gran simplicidad, sin embargo el uso directo de los MIP como adsorbentes en este tipo de técnica es escaso. Se han llevado a cabo estudios de fluoroquinolonas en huevos, tejidos y sueros con buenas recuperaciones [212, 213].

Membranas

La combinación de membranas líquidas con MIP fue propuesta por primera vez por Chimuka et al para la extracción del 17 β -estradiol en muestras acuosas [214]. Los compuestos fueron extraídos a través de una membrana porosa hidrofóbica unidos a partículas de MIP. Los MIP fueron preparados por polimerización en bloque. Experimentalmente, con esta técnica se ponen en contacto dos compartimentos separados por una membrana. El compartimento de

abajo se rellena con mezcla acuosa mientras que el superior está compuesto por la fase orgánica aceptora, a la que se añade una pequeña cantidad de partículas de MIP. Los analitos unidos a la matriz de la muestra son extraídos desde la fase acuosa a la fase orgánica y de ésta a los sitios de unión del MIP. El MIP es entonces separado de la fase orgánica por filtración y los analitos son liberados posteriormente con el eluyente adecuado.

3.5.2. Fase selectiva en técnicas de separación

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Dentro de la Química Analítica, las técnicas cromatográficas de separación son las que probablemente se han visto más beneficiadas con el advenimiento de la tecnología de impresión molecular. La capacidad de reconocimiento de las columnas cromatográficas se ve enormemente potenciada, basada en la retención del analito cuando atraviesa el polímero, permitiendo su separación, aunque pueda presentar bastantes limitaciones debido al carácter heterogéneo de las cavidades y al proceso de transferencia de masa y como consecuencia, hacer ensanchar los picos cromatográficos. Estos problemas surgían principalmente de la síntesis en bloque, por lo que se adoptaron distintas estrategias que permitieron minimizar dichos inconvenientes. De esta forma se han podido determinar de una manera rápida y sencilla carbohidratos, aminoácidos, péptidos, proteínas, drogas, fármacos, o pesticidas [215-219]. La combinación de la impresión molecular con la HPLC ha resultado tan eficaz, que se han descrito trabajos que permiten la separación de enantiómeros en mezclas racémicas, utilizando como fase estacionaria un polímero impreso con uno de los enantiómeros puros. [194, 220].

Electrocromatografía capilar (EC)

Su empleo como fase estacionaria une la eficacia de la separación electroforética con la selectividad del reconocimiento de los MIP. El relleno de la columna es sencillo, rápido y

económico y puede llevarse a cabo bien sintetizando el polímero y rellenando la columna posteriormente, o bien realizar la síntesis del polímero en el interior de la propia columna.

El primer método es el más habitual, sintetizando el polímero mediante cualquiera de las metodologías anteriormente descritas. Una vez formado el polímero, la columna se rellena manteniendo el polímero retenido mediante fritas [221].

La preparación también se puede dar en el interior de la columna obteniéndose fases estacionarias de mayor porosidad y permeabilidad. Estos capilares recubiertos se enlazan a las paredes del capilar. Esta fase estacionaria puede estar adsorbida, o unida covalentemente a la pared del capilar [222, 223]. Es una técnica sencilla que elimina los problemas de atasco de las columnas, aunque la capacidad de éstas es menor debido a la cantidad de polímero presente en el interior de la misma.

Con esta técnica se puede controlar el tamaño de partícula, su porosidad y el tipo de interacción con el analito, sin embargo, el empleo de fritas puede ser un inconveniente por la formación de burbujas que interrumpen la transmisión de campo eléctrico con el consiguiente ensanchamiento de los picos. Para evitar esto, se ha propuesto la formación de monolitos dentro del capilar que eliminarían las fritas que retendrían al polímero dentro del capilar [171].

El empleo de los MIP en electrocromatografía capilar proporciona separaciones eficaces y selectivas aunque el principal inconveniente es la necesidad de un flujo electroosmótico que impulse la fase móvil a través del capilar sin que perjudique la interacción entre el analito plantilla y los sitios de unión del polímero. Esto es debido a la incompatibilidad entre el medio necesario para favorecer la interacción analito-MIP, generalmente un disolvente polar, mientras que el flujo electroosmótico necesita un medio acuoso o disolución acuosa salina, por lo que este proceso ha de optimizarse para no perjudicar dicha interacción.

Se ha empleado en separaciones racémicas, aminoácidos, anestésicos o agentes beta-bloqueantes [148, 224-226].

3.5.3. Sensores

Un sensor es un dispositivo que debe responder de forma sensible, selectiva, continua, reversible y rápidamente a los cambios de concentración de una determinada sustancia en una muestra, por lo que debe de disponer de un elemento de reconocimiento. Los MIP como sensores presentan una gran versatilidad, siendo fácilmente adaptables a diferentes sistemas de transducción. En los últimos años se han desarrollado sensores basados en MIP para una alta variedad de compuestos y con muy buenos resultados [227]. Se ha avanzado en el desarrollo de nuevos formatos como membranas o filamentos y se han podido analizar numerosos analitos como pesticidas, fármacos, aminoácido o HAPs [228]. De esta forma se han podido determinar HAPs en agua de bebida en concentraciones que han llegado a ser del orden de las ppt [229]. En este caso, el MIP es preparado sobre láminas delgadas o capas, ya que esta configuración es la más útil en este tipo de aplicaciones, principalmente debido a sus rápidos tiempos de respuesta y sencillez de uso.

Por tanto, la técnica de impresión molecular se ha establecido recientemente como una alternativa prometedora a la nueva síntesis de materiales, empleándose en diferentes aplicaciones químicas, con características atractivas como su bajo coste, versatilidad, resistencia, alta selectividad y sencillez de preparación. Las aplicaciones de los MIP se han orientado fundamentalmente a la rama analítica de la química, donde su empleo como material adsorbente en SPE supone uno de sus usos más extendidos y de mayor interés actual.

3.5.4. Aplicaciones en HAPs y sus metabolitos

En el caso de los HAPs sólo unos pocos artículos se han dedicado a estos compuestos con esta metodología. Dickert et al en el año 2000, sintetizaron capas de MIP para HAPs que

utilizaron como sensores químicos para muestras de agua y aceite de motor [228, 230, 231]. En estos casos se empleaba poliuretano como matriz polimérica sin emplear monómeros funcionales.

En 2004 Lai et al [232] sintetizaron un polímero en bloque y en microesferas en suspensión para SPE-HPLC empleando B[a]Pyr como plantilla para diferentes monómeros funcionales y entrecruzantes [232]. Como consecuencia del estudio, se observó que la polaridad de ambos componentes influía en la afinidad de la retención en la columna, principalmente el entrecruzante. Dicha afinidad del polímero formado se incrementaba cuando descendía la polaridad de los monómeros y el entrecruzante. Las interacciones hidrofóbicas y los interacciones π - π entre el analito y la columna jugaban un papel importante en los procesos de retención. Las muestras empleadas fueron agua y café instantáneo a niveles de ppb, con buenos resultados en cuanto a la recuperación del analito (72,5 al 96,5%).

Debido al carácter carcinogénico del B[a]Pyr, otros autores optaron por desarrollar MIP capaces de determinar distintos HAPs sin la manipulación del B[a]Pyr. Es el caso de Baggiani et al [233] los cuales llevaron a cabo un estudio con MIP sintetizados como microperlas pero empleando como plantilla el Pyr para el reconocimiento de 22 HAPs, entre los que se encontraba el B[a]Pyr. Las microperlas formaron parte del empaquetamiento de una columna de HPLC. La formación del MIP estaba basada en el carácter hidrofóbico y los enlaces π - π entre el monómero funcional y la plantilla.

Para los derivados hidroxilados de los HAPs apenas se encuentran artículos publicados. En el año 2001 Kirsch et al [234] sintetizaron un MIP como sensor electroquímico para un electrodo de carbono usando como plantilla el 10HPyr. El MIP fue preparado usando divinilbenzeno y estireno como monómeros y MeOH como porógeno.

Más recientemente, en el año 2013, se publicó un trabajo para los derivados hidroxilados 2-naftol, 2-hidroxifluoreno, 9-fenantrol y 1OHPyr en muestras de suelo empleando un MIP como material adsorbente para SPE [235].

La síntesis de MIP para la detección de los HAPs parece una buena opción para determinar estos analitos. Al emplear estos materiales como adsorbentes, se minimiza el contacto con los mismos, permitiendo mayor grado de seguridad en su manipulación, factor de gran importancia debido a su carácter carcinogénico. Visto el escaso número de artículos publicados al respecto, se puede concluir que el desarrollo de MIP para los HAPs puede suponer un estudio interesante y de gran versatilidad para los HAPs y sus derivados hidroxilados.

4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y SUS BIOMARCADORES

El análisis de cualquier compuesto tiene dos etapas fundamentales de similar importancia. Por un lado el tratamiento de muestra y por otro el análisis instrumental. La preparación de muestra en un análisis es un proceso fundamental que incluye una serie de etapas previas cuya finalidad es hacer que el analito sea accesible al proceso de medida química. Los HAPs y sus biomarcadores suelen encontrarse en matrices complejas en muy bajas concentraciones, por lo que para aumentar la sensibilidad del análisis será necesario preconcentrar y extraer el analito de la matriz. Por otra parte, en el caso particular de los estudios de biovigilancia, la dificultad se ve aumentada debido a la limitada disponibilidad de las muestras y los pequeños volúmenes a tratar, siendo esencial un tratamiento eficiente de la muestra para conseguir resultados fiables.

A pesar de los grandes avances producidos en la última década en lo que respecta al análisis químico, la preparación de la muestra continúa siendo una etapa larga y crítica en el estudio de los contaminantes orgánicos, ya que en pocas ocasiones las muestras pueden ser analizadas directamente, constituyendo la mayor fuente de error en los procesos analíticos [236, 237].

La Figura 4.1 muestra el error relativo de cada etapa en un procedimiento analítico. La preparación de muestra representa el 61% del total de los errores, por lo que será importante controlar este paso que incluye tanto la extracción como la purificación, siendo la extracción del analito la etapa limitante [238].

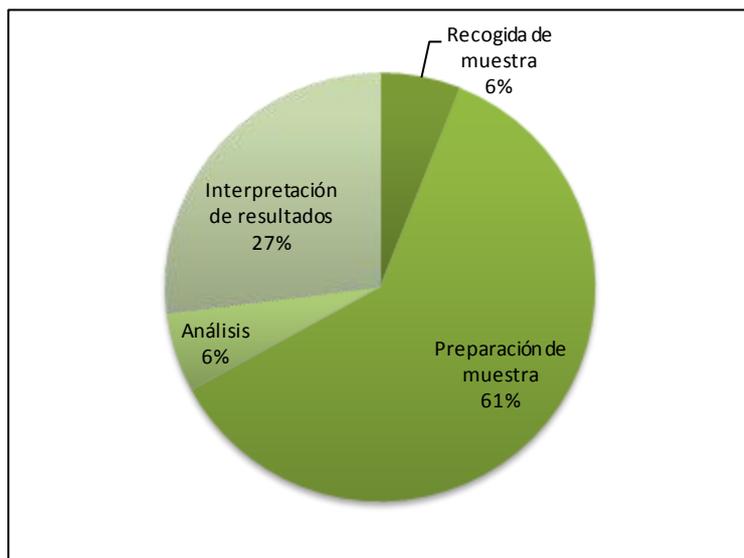


Figura 4.1. Error relativo en las diferentes etapas del procedimiento analítico

Es complicado estandarizar la preparación de muestra que estará condicionada por el número de muestras, analitos y por la complejidad de las matrices. La elección de una técnica va a ser por tanto, el resultado de un compromiso entre la eficiencia de la reproducibilidad de la extracción, facilidad del proceso, la consideración del coste, el tiempo, la posibilidad de automatización y la seguridad.

Sin embargo, se pueden generalizar que las características ideales de un tratamiento de muestras serían [236-238]:

1. Simplicidad en las operaciones para no añadir más errores a la etapa, con cortos tiempos de extracción, ya que como se ha dicho, la preparación de muestra conlleva una gran parte del análisis.
2. Se debe de buscar la máxima selectividad mejorando la cuantificación e identificación del analito, con el mínimo número de interferentes de la matriz después de ésta etapa.
3. El equilibrio debe estar basado en la extracción no exhaustiva, permitiendo múltiples extracciones de la misma muestra.

4. Los volúmenes empleados deben ser mínimos, respondiendo al interés creciente que demanda menor toxicidad de los disolventes utilizados y menor cantidad empleada de los mismos.

5. Se busca que el tratamiento de muestra sea versátil, con capacidad para poder ser analizado con diferente instrumentación analítica, automatizable, portable y preferentemente de muestras no invasivas.

En cuanto a la instrumentación analítica, habrá que tener en cuenta las propiedades físico-químicas de la muestra para poder relacionar la señal obtenida por el instrumental con la naturaleza y la concentración del analito.

La mayoría de las técnicas instrumentales se pueden englobar en una de estas tres áreas principales, espectroscopía, electroquímica y cromatografía. La medida se realiza sobre una variable de carácter físico o físico-químico, después de haber sometido a la muestra de interés a una interacción con algún tipo de energía (métodos ópticos, electroquímicos, térmicos...)

En los métodos ópticos espectroscópicos se mide la radiación electromagnética emitida por la materia o que interacciona con ella. Miden espectros y dependiendo del tipo de interacción pueden clasificarse en técnicas de absorción como la espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), infrarroja (IR) o de absorción atómica (AA), técnicas de emisión (atómica, de fluorescencia), técnicas de dispersión y aunque no es propiamente una técnica de este tipo, la espectrometría de masas. En este último caso no interviene la radiación electromagnética, sino que la muestra es ionizada midiéndose la relación masa/carga de los iones formados.

En los métodos electroquímicos la medida está basada en las propiedades eléctricas de una disolución de analito cuando forma parte de una célula electroquímica.

Los métodos de separación, donde se engloba la cromatografía, se dan como resultado de la mayor o menor capacidad del analito para ser retenidos por la fase estacionaria, es decir, se basa en los repetidos procesos de interacción durante el movimiento de los componentes de una mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo de la fase estacionaria (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre las distintas fases [65].

Alguna de estas técnicas se han combinado para extender la utilidad de los métodos haciéndolos más versátiles en los diferentes análisis. Un ejemplo de ellos sería la CG-MS, o la HPLC-FD como en el caso de esta memoria.

4.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La preparación de la muestra es una etapa complicada y crucial dentro del procedimiento analítico. Consume una gran cantidad de tiempo y contribuye al incremento de errores dentro del proceso. Los esfuerzos por mejorar esta etapa han dado como resultado la aparición de nuevas técnicas y estrategias que han contribuido a disminuir estos inconvenientes, mejorando los tiempos, disminuyendo la manipulación de los extractos o disminuyendo los volúmenes empleados tanto de muestra como de disolventes, muchas veces perjudiciales tanto para el operario como para el medio ambiente. La etapa de preparación de muestra está por tanto en continua evolución, ya que es la causa más frecuente de pérdida de analitos y contaminaciones. La tendencia actual es eliminar o reducir todas estas dificultades mediante el desarrollo de nuevas técnicas o la modificación de las ya existentes.

Se ha conseguido con ello preparaciones de muestra más rápidas, más efectivas, generando menores costes y residuos que los dados por los procesos convencionales. Técnicas como la MSPD o la SPE son ejemplos de ello [79, 239].

Considerando la complejidad de las matrices donde pueden encontrarse los HAPs y sus metabolitos, la disponibilidad limitada de las muestras sobre todo en estudios de biovigilancia, o incluso las implicaciones legales que su concentración pueden acarrear, la preparación de muestra hay que tenerla en cuenta como una etapa muy crítica de todo el proceso.

En este apartado se van a recoger diferentes métodos de preparación de muestra utilizados para el análisis de HAPs y sus metabolitos de una forma diferenciada en base a la naturaleza de la muestra, pormenorizando posteriormente, en aquellas metodologías que han sido relevantes en esta memoria.

Métodos de preparación en muestras líquidas

Aunque los HAPs tienen un marcado carácter hidrofóbico, estos contaminantes están presentes en medio acuoso debido a su adsorción en la materia particulada. La gran cantidad de estos contaminantes que se vierten al medio ambiente contribuyen a que se acumulen en fuentes de abastecimiento tanto subterráneas como superficiales, así como en otros medios acuosos. La determinación de HAPs en estos medios no es sencilla debido a las bajas concentraciones en las que se encuentran como consecuencia de su baja solubilidad en agua y de que pueden adsorberse en las paredes de los recipientes que contienen la muestra [240]. La cuantificación de rutina de estos niveles, establecidos por las distintas organizaciones, requiere del desarrollo de métodos analíticos que proporcionen extracciones muy eficientes y que permitan su determinación de manera simple, rápida y con bajo coste [78].

Dentro de las técnicas tradicionales, la extracción líquido-líquido (LLE) es una técnica habitualmente empleada en muestras acuosas. Está basada en la transferencia de los analitos desde la muestra hacia un disolvente inmiscible en agua. Debido al carácter hidrofóbico de los HAPs, éstos pueden ser extraídos de su matriz con un disolvente apolar, como pueden ser el hexano o el diclorometano [241, 242]. Este último disolvente es el que se emplea en los métodos oficiales de la EPA, concretamente el 550 para la determinación de HAPs en aguas

destinadas al consumo humano y el 610, para la determinación de estos compuestos en aguas residuales. [243, 244]. Esta técnica ha sido empleada en diferentes muestras de agua provenientes de ríos, lluvia, lagos o mar [245-248]. También se ha empleado en muestras de orina para determinar derivados hidroxilados de los HAPs [249]. Presenta el inconveniente de ser lenta y laboriosa, con un elevado consumo de disolvente y la posibilidad de formar emulsiones con la consiguiente necesidad de etapas adicionales.

La extracción en fase sólida o SPE, es otra técnica de preparación de muestra basada en la retención selectiva de los analitos sobre un adsorbente por el que tienen afinidad, para posteriormente, ser eluidos con el disolvente adecuado. Seleccionando tanto los adsorbentes adecuados como los disolventes de elución se pueden conseguir extracciones muy selectivas.

Esta técnica se ha empleado en la extracción de HAPs y sus metabolitos en diferentes matrices, como agua, carnes hechas a la barbacoa, orina o café [117, 232, 250-252].

Como fase estacionaria se pueden emplear varios adsorbentes, como el C-18 o las nuevas técnicas, que emplean nuevos materiales [133] como pueden ser los polímeros de impresión molecular (MIP), mejorando la selectividad hacia el analito de interés [135, 137, 203, 253, 254]. La EPA emplea este sistema con cartuchos C-18 para la extracción de HAPs en aguas destinada al consumo humano en el método 550.1 [255].

Esta técnica presenta la ventaja de utilizar menores volúmenes de disolvente que la LLE, además pueden ser automatizables.

De esta forma, la miniaturización se ha convertido en una tendencia actual ya que mejora y minimiza errores frente a las técnicas tradicionales. Aparecen, por tanto, las técnicas de microextracción. Presentan entre sus características fundamentales el ser rápidas, sencillas, con bajo coste, minimizando la manipulación de la muestra y logrando mayor precisión y

sensibilidad, disminuyendo tanto la cantidad de reactivos como la cantidad de muestra, se consiguen sistemas no tan dañinos para el medio ambiente [79].

En la determinación de HAPs se han empleado técnicas de microextracción, como pueden ser la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción con barras agitadoras (SBSE), microextracción en fase líquida (LPME) o la microextracción en gota suspendida (SDME).

En la SDME la fase extractante es una microgota de disolvente orgánico suspendida del extremo de una microjeringa y expuesta a la muestra. Después del período de extracción, la gota se retrae hacia la microjeringa inyectándose en el sistema [256]. Es una técnica sencilla, rápida y de bajo coste. Su principal desventaja la puede tener en la inestabilidad de la gota, causando problemas en la repetitividad del proceso. De esta forma se han extraído, por ejemplo, HAPs en aguas [257, 258].

Otro ejemplo sería la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Fue introducida en 2006 para la determinación de compuestos orgánicos en agua, entre los que se analizaron los HAPs [259]. También se ha empleado en metabolitos en muestras de orina [260]. Esta técnica consiste en la formación de un sistema de disolventes ternario, donde se utiliza una mezcla de disolventes de gran densidad (extractante) y un disolvente polar (dispersante). Cuando la muestra acuosa se mezcla con el dispersante y el extractante se forma una mezcla ternaria de gran turbidez, debido a las gotas formadas a través de la muestra acuosa. Como el área superficial entre el disolvente de extracción y la muestra es elevada, el equilibrio se alcanza rápidamente extrayendo así los analitos. Al proceso le sigue una centrifugación para obtener una fase sedimentada. De esta forma los analitos han quedado concentrados y extraídos en el disolvente de extracción.

En la extracción con disolventes asistida por membranas se utilizan membranas hidrofóbicas no porosas. Los analitos orgánicos presentes en muestras acuosas difunden a

través de la membrana concentrándose en el volumen de disolvente orgánico [261]. Esta técnica es muy adecuada en muestras complejas con un alto contenido de materia orgánica. Se ha empleado para extraer HAPs en matrices como agua, zumos, vino o leche [262, 263].

La microextracción en fase sólida (SPME) se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. El pequeño diámetro de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa de forma que facilita su manipulación y protección cuando la fibra no se utiliza [264]. La extracción se ve afectada por el recubrimiento polimérico, la temperatura, el tiempo de extracción, el efecto salino, el pH, el volumen de la muestra, la agitación y derivatización. Es un método con grandes posibilidades de portabilidad y automatización, simple y que puede ser acoplado fácilmente con instrumentación analítica.

Por el momento, los recubrimientos de fibra son caros y el tiempo de vida de la fibra puede ser limitado, aunque la SPME se ha empleado numerosas veces en la extracción de HAPs y en metabolitos hidroxilados en orina [265-268].

Otra técnica que se emplea es la extracción con barras agitadoras que consisten en unas barras recubiertas de un polímero. El proceso de extracción está basado en el equilibrio polímero-agua en dos etapas, extracción y desorción. La barra se pone en contacto con la muestra y se agita bajo condiciones controladas de tiempo, volumen, velocidad, temperatura, y las dimensiones de la barra. Tras la extracción viene la etapa de desorción térmica o líquida. Este tipo de técnica se ha empleado para la extracción de HAPs en diferentes muestras de agua o hielo [269, 270] o con el biomarcador 1OHPyr en orina [271, 272].

Métodos de preparación de muestras sólidas

Entre los métodos de extracción que se emplean para muestras sólidas destacan:

La extracción Soxhlet es la técnica clásica de extracción en muestras sólidas. La principal desventaja que presenta esta técnica es el elevado consumo de disolvente y el tiempo requerido para el análisis que suele llegar a ser de entre 8 y 48 horas [273]. Esta técnica se ha empleado para la extracción de HAPs, por ejemplo, en suelos, lodo, sedimento, pescado, y alimentos [274-276].

La extracción asistida por ultrasonidos (USE) es otra técnica tradicional. Son ondas sonoras con una frecuencia de vibración de entre 16 kHz a 1GHz que generan en el medio una cavitación acústica, es decir la formación de burbujas y su posterior implosión. Esto hace que se generen microgradientes de elevada presión y temperatura durante cortos intervalos de tiempo. El efecto mecánico de los ultrasonidos favorece la penetración del disolvente en el sólido, acelerando la transferencia de masa y mejorando la eficacia. Es un método sencillo que no requiere un equipo especializado. En HAPs se ha empleado en suelos, sedimentos, lodo, alimento o material biológico [277-279]. De igual forma, esta técnica se ha empleado en muestras de aire para compuestos hidroxilados como el 1OHPyr o el 2OHPhe [280].

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) emplea para la extracción fluidos supercríticos los cuales presentan propiedades intermedias entre un gas y un líquido, lo que favorece su penetración en las distintas matrices. Se puede variar la densidad de los mismos variando la presión y la temperatura, por lo que las extracciones pueden ser muy selectivas. [281]. El fluido se bombea a una presión superior a su punto crítico a través de la muestra. La temperatura de ésta aumenta hasta superar dicho valor crítico. Después de la despresurización, los analitos se recogen en un pequeño volumen de disolvente o en un adsorbente. Entre sus principales ventajas se pueden citar las siguientes: pequeños volúmenes de muestra y disolvente, reducido tiempo de análisis, procesos fácilmente automatizables y

baja toxicidad. Entre sus desventajas cabe citar el alto coste del equipo. En HAPs y sus derivados se ha empleado por ejemplo, en lodos, suelo o alimentos [282-287], incluido el biomarcador 1OHPyr en muestras de agua y sedimento [288].

La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica que constituye una herramienta poderosa que permite extracciones rápidas y eficientes en matrices que tienen una gran complejidad. Entre sus ventajas se pueden citar la de realizar extracciones simultáneas, permitiendo la reducción del tiempo de extracción y el consumo de disolvente. Se basa en el uso de la energía generada por las microondas para conseguir que los analitos de interés pasen de la muestra a un disolvente. El interés por esta técnica ha aumentado en estos últimos años. En 1994 López-Avila et al presentaron la primera publicación donde se aplicaba esta técnica para la extracción de varios contaminantes en suelos entre los que se encontraban los HAPs [289]. La MAE resuelve algunos de los problemas asociados a otras técnicas como una disminución del tiempo de extracción y una reducción del volumen de disolvente. Su mayor limitación es que el disolvente ha de separarse físicamente de la matriz, mediante filtrado o decantación después de la extracción. Otras matrices en las que se ha empleado esta técnica para la extracción de HAPs han sido alimentos [290], galletas [279], pescado [291] y suelo, en el que también se han podido determinar los derivados hidroxilados, entre ellos el 1OHPyr [235, 292], por citar algunos.

La extracción con líquidos presurizados (PLE) combina la extracción con disolventes a alta temperatura y presión, lo que conduce a procesos más rápidos, empleando para ello volúmenes menores. Es una técnica altamente automatizada, a tener en cuenta en análisis de rutina [293].

Para la extracción en HAPs se ha empleado en diferentes matrices con recuperaciones igual de efectivas que en las técnicas tradicionales. Por ejemplo se ha empleado en muestras de café [294], muestras de mejillón [295] o en suelos [296].

Esta técnica es útil en análisis de rutina en muestra medioambientes y alimentos, dando como resultado medidas altamente reproducibles. Entre sus inconvenientes, el elevado coste del equipo y la complejidad de la etapa de preparación.

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) fue introducida por Barker et al en 1989 [297]. Está basada en la disrupción de la muestra y la extracción de los analitos de matrices sólidas o semisólidas. A la vez que se produce la disrupción de la muestra se genera un material que posee un carácter cromatográfico único, lo que permite la separación de los analitos de interés. Ofrece la posibilidad de realizar un fraccionamiento de los componentes de la matriz, eluyendo selectivamente uno o varios compuestos de una misma muestra. Se reduce el tiempo y el consumo de disolventes al aunar la etapa de extracción y limpieza a un único paso [211]. Entre las matrices empleadas para la extracción de HAPs con ésta técnica se puede citar, aguas residuales [298], miel [299], suelos [300] o algas, matriz en la que se analizan, tanto HAPs como sus metabolitos[301].

4.2. ANALISIS INSTRUMENTAL

Debido a sus características físico químicas, los HAPs pueden ser determinados con un gran número de técnicas instrumentales. Al ser compuestos que presentan fluorescencia, los detectores fluorescentes aportan gran sensibilidad al análisis. La determinación de los HAPs se realiza habitualmente mediante HPLC o CG acopladas a diferentes sistemas de detección.

La cromatografía líquida (HPLC) es la técnica de separación más ampliamente utilizada en la determinación de HAPs. Esta técnica ofrece una gran versatilidad debida a la posibilidad de actuar sobre la selectividad entre los compuestos, modificando las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria, lo que se consigue eligiendo y optimizando la columna y la composición de la fase móvil. La HPLC se emplea con un gran número de HAPs y sus metabolitos incluso de alto peso molecular, los cuales no pueden ser analizados mediante GC.

La detección UV y FD son las más utilizadas para la determinación de estos compuestos tras su separación mediante HPLC, aunque también se han realizado estudios donde se acoplaba HPLC-MS para HAPs y sus metabolitos [75, 302, 303]. Esta técnica cromatográfica ha sido empleada con numerosas matrices, entre ellas muestras de leche, tanto humanas como de rumiantes o de preparados alimenticios [304], en alimentos infantiles [46], o en sedimentos marinos, empleando como detector el espectrofotómetro de diodo array o DAD [305], por citar algunas. Por otra parte, los espectros de UV ofrecen información muy útil a la hora de confirmar identidades [292, 306].

Sin embargo, el detector de fluorescencia sigue siendo uno de los más utilizados debido a que ofrece una gran sensibilidad y selectividad porque muy pocas moléculas presentan fluorescencia. Este tipo de detector permite la determinación a nivel traza de los analitos, lo que en muestras medioambientales o de biovigilancia, donde las matrices son complejas, es muy importante. Se ha empleado en suelos, sedimentos, lodos, agua o carne para consumo [242, 292, 307, 308].

La detección mediante espectrometría de masas (MS) o el tándem MS-MS es más selectiva que la FD. Sus resultados son más exactos, permitiendo la identificación de compuestos con picos cromatográficos no resueltos. Es una técnica más cara, por lo que la FD sigue siendo la más utilizada y disponible en cualquier laboratorio. Mediante ésta técnica se han determinado HAPs o sus metabolitos en muestras de gasolinas [309], mejillón [310] o aguas [311].

La cromatografía de gases (GC) se emplea habitualmente ya que tiene un elevado poder de resolución. La detección se suele llevar a cabo mediante un detector de ionización de llama (FID) o masas (MS), la cual aporta una mayor sensibilidad. La retención y separación en esta técnica se ve afectada por el tipo y cantidad de disolvente, las condiciones de inyección y el programa de temperatura. Los HAPs de bajo peso molecular eluyen antes que los

compuestos con mayor peso. Es importante optimizar la fase estacionaria adecuada. Estas suelen ser compuestos metil y fenil polisiloxanos [310]. Hasta el momento, no se dispone de una columna cromatográfica que permita la separación de todos los HAPs que se encuentran en el medio ambiente, por lo que para la cuantificación de estos analitos se emplean múltiples columnas, incrementando el coste y tiempo de análisis.

El empleo de GC/MS frente al GC/FID para el análisis de matrices complejas como pueden ser las empleadas en biovigilancia ofrece la oportunidad de obtener resultados notables en términos de sensibilidad y selectividad. Por ejemplo, Romanoff et al [312] determinaron 23 metabolitos hidroxilados, entre los que se encuentran varios biomarcadores, encontrándose límites de detección del orden de los pg/mL. Wang et al [313] estudiaron la contaminación del aire, analizando tanto HAPs como sus derivados hidroxilados. Gupta et al [260] determinan metabolitos hidroxilados en muestras de orina empleando un GC-MS-MS.

Uno de los detectores más utilizados junto en MS es el detector de impacto electrónico con cuadrupolo (EI). Aunque la fragmentación de los HAPs es poca, las señales son intensas consiguiéndose bajos límites de detección [314]. Es un método sencillo con un coste razonable por lo que su utilización es muy habitual. Se ha empleado en miel para la determinación de HAPs [299], en orina para la detección de derivados hidroxilados entre los que se encuentra el biomarcador 1OHPyr [267, 268] o en derivados hidroxilados del fluoreno [117], por ejemplo.

La ionización química negativa y positiva (PCI/NCI) son modos de ionización alternativas al anterior. En la ionización química se forman iones a partir del “gas reactivo” por bombardeo de electrones. Los iones del gas reactivo sufren reacciones con moléculas de la muestra, produciendo iones de los mismos. El gas reactivo más común es el metano. Empleando como gas reactivo amonio y demetil éter, Riahi et al obtuvieron resultados más selectivos para compuestos de los HAPs [315]. De igual forma, Yurchenko et al emplearon

amonio como gas reactivo (GC-NCI/MS) para compuestos de pescado, ahumados y aceites [316], viendo en su estudio que los valores eran similares a los obtenidos por HPLC y que la ionización química positiva era más selectiva para estos compuestos, llegando a resultados del orden de 0,3 ppb. Los compuestos hidroxilados de los HAPs también se han podido determinar con ambos modelos de ionización, medidas con las que se han llegado a obtener límites de detección del orden de los ng [317].

Otra alternativa es la MS con trampa de iones (I-MS) empleada por ejemplo en agua de mar, mejillones, o sedimentos [248, 318]. Este detector se ha empleado para determinar el biomarcador 1OHPyr en orina [319] o el metabolito del pireno 1OH glucósido en tejido marino [320].

La cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) proporciona una respuesta proporcional al número de carbonos, por lo que se pueden cuantificar compuestos dentro del mismo grupo de isómeros. En muestras medioambientales se han detectado HAPs en partículas aéreas [321], aguas [322] o en sedimentos [323]. De igual forma se han determinado compuestos hidroxilados de HAPs en muestras de orina con recuperaciones en torno al 76% [324].

Otros detectores más actuales incluyen la TOF/MS (espectrometría de masas/"tiempo de vuelo") que utiliza láser de superficie y espectrometría de masas para analizar mezclas complejas. Uno de los aspectos más importantes es que se puede adquirir la masa exacta, la información *full-scan* y los datos cuantitativos de manera muy rápida. Tiene una gran resolución respecto al cuadrupolo simple. Se ha empleado para determinar HAPs en muestras de té [325], aceites [326] o cenizas [327]. Así mismo, se han podido llevar a cabo estudios de biovigilancia para medir la exposición de HAPs en población no fumadora con proximidad a una planta de aluminio. En este estudio se analizan tanto HAPs (pireno, naftaleno, criseno, fluoranteno, benzo[a]antraceno), como el biomarcador 1OHPyr [328].

Dentro del estudio de la biovigilancia ha cobrado importancia la GC acoplado a un radioisótopo (IRMS). Esto es debido a que con esta técnica pueden determinarse las fuentes de emisión de HAPs al medio. La GC está acoplada a un horno de combustión, de modo que la composición isotópica del CO₂ resultante se analiza continuamente con un MS. La relación entre el compuesto a analizar y el isótopo sirve para determinar cuantitativamente las fuentes de emisión de los HAPs. Esta técnica se ha empleado en estudios de contaminación tanto marinos como terrestres [329, 330].

En la siguiente Tabla 4.1 se muestran los métodos de detección propuestos por la EPA para distintos HAPs en distintas matrices.

Tabla 4.1. *Métodos seleccionados de la US EPA para la determinación de HAPs en el medio ambiente*

Método	Enfoque	Título del documento	Ref
TO-13A	Determinación de HAPs en ambiente empleando CG/MS	"Compendium of Method for de Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air" Second Edition	[331]
525.2.Rev 2.0	Compuestos orgánicos por extracción L-S y columna capilar GC/MS	Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water-Supplement III	[332]
550, 550.1	HAPs, extracción L-L y HPLC - UV y detección FD	"Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water-Supplement I"	[255]
610	Métodos para el análisis de compuestos orgánicos de agua municipal e industrial de desecho. HAPs	Guideline establishing test procedures for the analysis of pollutants	[333]
8270C	Compuestos orgánicos semivolátiles por GC/MS	"Test Methods for evaluating solid waste, physical Chemical methods"	[334]
8275A	Compuestos orgánicos semivolátiles (HAPs y PCBs) en suelos y lodos. Extracción térmica y GC/MS	Test Methods for evaluating solid waste, physical Chemical methods"	[334]
8100	HAPs (GC)	Test Methods for evaluating solid waste, physical Chemical methods"	[334]
8310	HAPs (HPLC)	Test Methods for evaluating solid waste, physical Chemical methods"	[334]
No especificado	Preparación de muestra y análisis de contaminantes en pescado y tejido de pescado	Guidance for assessing Chemical contaminant data for use in fish advisories"	[335]

El 1OHPyr, como biomarcador principal de exposición de HAPs, ha sido analizado en numerosas matrices, por ejemplo, Chahin et al llevaron a cabo un estudio del 1OHPyr en rumiantes a los que expusieron a la ingestión de HAPs, midiendo sus metabolitos en orina y leche [47]. Con este estudio observaron una muy buena correlación entre la dosis de Pyr ingerida y la cantidad transferida a la leche y recogida en orina. También observaron que la cantidad encontrada en orina frente a la leche, era del orden del 10 veces superior, confirmando que la mayor ruta de eliminación para este tipo de xenobióticos es la orina. La determinación se realizó con un HPLC-FD. Otros autores como Guiavarc'h o Grova, han confirmado estas conclusiones, realizando este tipo de estudios con diferentes rumiantes y con diferentes técnicas como pueden ser la GC-MS [38, 53].

La matriz más empleada para el análisis del 1OHPyr es la orina, debido a que el Pyr al metabolizarse se transforma en 1OHPyr. Principalmente, en los estudios de biovigilancia esta matriz presenta varias ventajas. Es una muestra no invasiva, con un volumen adecuado y no siendo demasiado compleja. Este analito se ha determinado mayoritariamente con HPLC-FD aprovechando la naturaleza fluorescente también de los derivados hidroxilados. Por ejemplo Shahtaheri et al [45, 336] determinaron este analito en varios estudios de biovigilancia basándose en que el Pyr es el mayor componente de HAPs en aire, guardando una relación entre 1,1 y el 3,8 % del total de HAPs presentes en este medio. Los resultados obtenidos en muestras de orina para medir la exposición humana fueron del orden de los ppb ($\mu\text{g/L}$). El rango de concentración en orina tanto de trabajadores expuestos como no expuestos suele encontrarse entre 0,25-25 $\mu\text{g/L}$. [337]. Otros estudios como los de Wang et al [338] analizaban el 1OHPyr junto con otros derivados hidroxilados de los HAPs, obteniendo los mismos ordenes de trabajo de concentración en orina. Por lo tanto, la concentración a la que se suele trabajar en muestras de orina está situada en el orden de las ppb [107]. Por otra parte, aunque existen estudios donde se alcanzan niveles de detección del orden de las ppt (ng/L) [272], las

concentraciones en las que se suele encontrar el 1OHPyr en orina tanto en trabajadores expuestos como los que no, son del orden anteriormente mencionado.

Otras técnicas que se han empleado para los HAPs o sus metabolitos han sido, por citar las más empleadas, HPLC con detección ultravioleta [339], HPLC con detector de masas (MS), con detector diodo array o DAD [340, 341], técnicas quimioluminiscentes de ensayos enzimáticos [342], cromatografía de gases-masas (GC-MS) [266, 267, 312, 343], GC con detector de ionización de llama [344], HPLC-MS-MS [345], o electroforesis capilar [346].

La Tabla 4.2 recopila algunas referencias bibliográficas tratadas a lo largo de este capítulo, resumiendo los tipos de analitos y las diversas técnicas empleadas así como los diferentes resultados analíticos obtenidos.

Tabla 4.2. Resumen bibliográfico del análisis de HAPs y sus metabolitos

Analito	matriz	Técnica Extracción	Técnica detección	LOD	R%	RS%	Ref
3OHB[a]pyr	Orina	SPE	HPLC-FC	0,07 pmol/L		3-4	[252]
Derivados hidroxilados	Orina	SPE/SPME	CG-MS	0,8-43,5 ng/L			[266]
Benzo[a]pyr	Café y agua	MISPE-	HPLC-FD		72,5-96,5		[232]
Derivados hidroxilados	Orina	SPE	HPLC-MS	0,002-0,010 mug/L		7-27%	[75]
HAPs	Lodos	Soxhlet-SFE	HPLC-FD	0,1-1 mg/kg	70	6-20	[282]
HAPs	Suelo	SFE	HPLC	3,23-9,06 mg/kg	95-100%		[283]
HAPs	Carne	SFE	HPLC	0,2-0.6 mug/kg	77-103	<10	[290]
HAPs	Pescado	SFE	GC/MS	9,5-13,5 mung/g	100		[285]
HAPs	Galletas	SFE/Soxhlet/USE	HPLC/FD	0,05-0,7 ng/g	95-105		[279]
HAPs	Polvo	PLE	HPLC		88,5-113	2-6.7%	[293]

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y SUS BIOMARCADORES

Analito	matriz	Técnica Extracción	Técnica detección	LOD	R%	RS%	Ref
HAPs	Café	PLC	HPLC-DAD CG-MS	0,11-0,18 µg/kg	70-106%		[294]
HAPs	Mejillón	PLC	GC-MS	0,1-0,25 µg/kg	70-110	4-14	[295]
HAPs	Agua residual	MSPD MAE	HPLC-FD	0,0001-0,005 µg/g	76-104	0,07-1,5	[298]
HAPs	Miel	MSPD	CG/MS	0,04-2,9 µg/kg/h	80-101	6-15	[299]
HAPs y derivados del benzo[a]pireno	Algas	MSPD	HPLC-FD	2-6 µg/mg	40-66	<5	[301]
HAPs	Lodos	MAE	HPLC-FD	4-62 ng/g	52-110	<10	[292]
HAPs	Pescado y aceite		HPCL GC-MS	0,3 ppb	75-87	7-13h	[316]
HAPs	agua	SPE	GC-MS	15-120 ng/L		<10	[322]
HAPs	Pescado	MAE	HPLC-FD	0,07-0,53ng/g	90	0,9-4,9	[291]
HAPs	Suelo	MSPD	HPCL-FD	0,01-0,6 ng/g	94	<2	[300]
HAPs	Leche	Extracción L-L	HPLC-FD	1,3-76ng/kg	94	3,5-9,8	[304]
HAPs	Sedimento marino	MAE-SPE	HPLC-DAD-PCI-MS	100 ng/g (ppb)	47-102	11-13	[305]
1OHPyr	Orina	Extracción L-L -	HPLC-FD	0,2 µg/L	87,32	0,07-0,88	[45]
1OHPyr	Orina	SPE	HPLC-FD	0,02 µg/L	99,96	<3	[336]
1OHPyr	Orina	SPE	HPLC-FD	5 ng/L	99	2-4	[337]
1OHPyr	Orina	SPE	HPLC-FD	0,044 µg/L	62-83	2,3-7,3	[338]
Derivados hidroxilados HAPs	orina	MSPE	CG-MS	0,1 µg/L	98-121	<14	[267]
1OHPyr	Orina	SBSE	GC-MS	2 ng/L(ppt)		5-6,3	[272]

De la Tabla 4.2 se extraen varias conclusiones, la primera es que la capacidad instrumental disponible en Química Analítica hace posible detectar contaminantes en

muestras medioambientales en concentraciones del orden de las ppt. Se observa una tendencia actual en el desarrollo de nuevas metodologías basadas en la miniaturización y simplificación de protocolos, reduciendo el consumo de disolventes, el tiempo empleado en cada análisis, la cantidad de muestra requerida, disminución de costes y disminución también de los residuos generados y por consiguiente más cuidadosos con el medio ambiente [78].

Consultando la bibliografía se concluye además, que las dos técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de los HAPs y sus biomarcadores son la GC/MS y la HPLC/FD. Aunque la mayor parte de los HAPs clasificados por la EPA como contaminantes prioritarios pueden ser analizados por GC, la HPLC es más rápida, siendo aplicable a la mayoría de los analitos. Aunque no compite con la GC en términos de alta eficacia, la gran variedad de fases estacionarias disponibles son capaces de proporcionar una selectividad única en compuestos que son difícilmente separables mediante la GC. Entre los detectores utilizados en HPLC, el de fluorescencia es el más utilizado ya que aprovecha las características fluorescentes de los HAPs. Aunque la detección UV es casi universal para estos compuestos, el FD ofrece una mayor sensibilidad y selectividad para la detección de HAPs. Seleccionando las longitudes de onda adecuadas, se puede alcanzar un elevado grado de selectividad para cada HAPs individual o bien, llegar a un compromiso entre varios compuestos que eluyen en un tiempo muy próximo.

Aun habiendo técnicas que ofrecen detecciones más selectivas, la fluorescencia sigue siendo un método sensible y barato para la determinación de estos compuestos, además de ser una instrumentación común en cualquier laboratorio de rutina.

IV. Parte experimental



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han empleado los siguientes reactivos, materiales e instrumentación:

5.1.1. Reactivos

- 1-hidroxipireno en concentración 10 ng/ μ L en acetonitrilo, Dr Ehrenstofer (Alemania)
- 1-hidroxipireno sólido cristalino, Dr Ehrenstofer (Alemania)
- 1-hidroxifenantreno, 2-hidroxifenantreno, 3-hidroxifenantreno y,4-hidroxifenantreno, todos ellos en concentración 10 ng/ μ L en acetonitrilo, Dr Ehrenstofer (Alemania)
- Ácido metacrílico ydimetilacrilato de etilenglicol, Sigma-Aldrich (España)
- 2-2-Azo(bis)isobutironitrilo, Fluka (Suiza)
- Metanol (MeOH), grado HPLC, Scharlau (España)
- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC, Scharlau (España)
- Diclorometano (DCM), grado HPLC, Fluka (Suiza)
- Sulfato de sodio anhidro, Panreac (España)

5.1.2. Disoluciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo se prepararon con el estándar comercial de 1OHPyr en ACN en la concentración adecuada. Estas muestras eran preparadas diariamente y conservadas en frascos color ámbar para preservarlos de la fotodegradación.

Las muestra de orina fueron recogidas de niños recién nacidos y conservadas a -20 °C hasta su análisis. Se ha tenido en cuenta su baja exposición a HAPs para considerar estas muestras como blanco del estudio.

Las muestras de leche materna fueron recolectadas de una madre lactante voluntaria, conservadas a -20 °C hasta su utilización.

5.1.3. Equipos

- Sistemas de purificación de agua Milli-Q de Millipore, Ibérica (España)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies (España), acoplado a un detector, Hewlett Packard 1046 A, (EEUU) controlados a través del software Chemstation for LC System (Agilent Technologies)
- Espectrofluorímetro, Perkin Elmer LS 55 (EEUU) controlado por el software FL WinLab

Otro equipamiento

- Balanza de precisión, Mettler AE 200 (España)
- Baño ultrasónico, Selecta Ultrasons (España)
- Centrifugadora angular 6, Selecta (España)
- Placa calefactora con sistema de agitación, Ovan (España)
- pHmetro Basic 20, Crison Instruments, (España)
- Equipamiento para Soxhlet, Scharlau (España)
- Estufa, Selecta (España)
- Sistema de vacío para extracción en fase sólida (SPE) dotado de 20 colectores, Varian Technologies (EEUU) acoplada a una bomba de vacío, Selecta (España)
- Horno microondas CEM MARS 5, Vertex Technics (EEUU)

- Bomba peristáltica del sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), minipuls 2, Gilson (EEUU)

5.1.4. Otro material

- Columna analítica ZORBAX Eclipse PAH (4,6x150 mm, 3,5 μm) con pre-columna empaquetada con el mismo material (Salva Eclipse PAH 4,6x12,5 mm 5 μm), Agilent Technologies (España)
- Cartucho para SPE de 1mL de capacidad, Agilent Technologies (España)
- Cartucho de SPE Isolute 50 mg de C-18 de 1 mL de capacidad, Symta(España)
- Fritas para cartucho SPE de 1mL, $\frac{1}{4}$ " , 20 μm , Varian (EEUU)
- Filtros de polipropileno Whatman PPW/GMF con un tamaño de poro de 0,45 μm , Sigma-Aldrich (España)
- Malla de Nital de 25 μm de tamaño de poro, Saferr Nital (EEUU)
- Vasos Green Chem para la extracción asistida por microondas (MAE), Vertex Technics (EEUU)
- Tubos de teflón para el desarrollo FIA 0.8x1.6 mm, Sigma Aldrich (España)
- Cubetas de cuarzo Hellma 176.051-QS (Quartz Suprasil [®]) 150 μL , Perkin Elmer (EEUU)
- Filtro Cameo 3N Syringe Filter, Nylon 0,45 Micron, 300 mm, 100/Pk, Scharlab (España)

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Determinación analítica del 1OHPyr

Los procedimientos seguidos en el estudio de las variables experimentales para los distintos sistemas y métodos de determinación del 1OHPyr, se describen en detalle en los apartados correspondientes.

No obstante, se va a describir a continuación la determinación analítica del 1OHPyr que será común en los diferentes apartados de esta Memoria.

5.2.2. Procedimiento cromatográfico

Para determinar las recuperaciones y validar los procedimientos propuestos se analizaran las concentraciones del analito en las diferentes etapas mediante cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia (HPLC-FD).

Así, la identificación y cuantificación del 1OHPyr se llevó a cabo empleando un equipo HPLC (*Agilent Technologies 1260 Infinity*) con columna ZORBAX Eclipse PAH (4,6x150 mm, 3.5 μm). Previa a la columna se acopló una pre-columna empaquetada del mismo material para salvaguardarla.

La elución se llevó a cabo en modo isocrático empleando como fase móvil una mezcla MeOH/H₂O de (88:12, v/v), a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se mantuvo a temperatura ambiente. La columna y las longitudes de onda de excitación y emisión ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$) fueron 242 y 388, respectivamente, con una ganancia de 10 para el detector de fluorescencia. En estas condiciones se obtenía la elución del analito en un tiempo total de 3,2 minutos (Figura 5.1). La muestra se inyectó manualmente empleando un bucle de 20 μL . El detector de fluorescencia utilizado fue un Hewlett Packard 1046. Todo el equipo fue controlado por el software Chemstation de Agilent Technologies preparado para HPLC-FD.

La elección y optimización del método cromatográfico tuvo como prioridad la sencillez, intentando evitar la utilización de medios salinos, y gradientes.

El procedimiento cromatográfico fue optimizado para analizar el 1OHPyr y los isómeros hidroxilados del fenantreno.

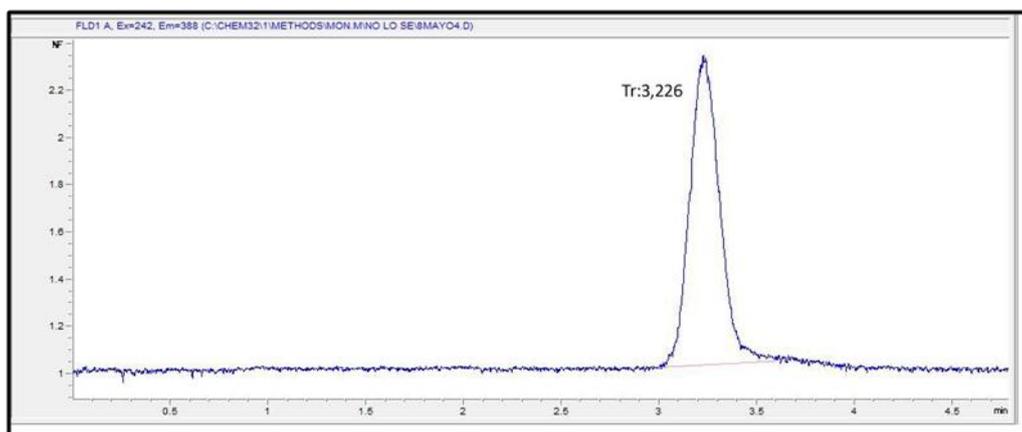


Figura 5.1. Cromatograma del 1-hidroxipireno

5.2.3. Optimización del método cromatográfico (HPLC-FD)

Para la elección del método cromatográfico se realizó una revisión bibliográfica de los distintos métodos publicados [46, 47, 54, 99, 101, 102, 105, 108, 120, 338, 341, 345, 347-358]. Sobre todo, se priorizó la búsqueda de procedimientos rápidos y sencillos que evitasen los medios salinos en la fase móvil [347] y si fuera posible en modo isocrático [357]. Para el desarrollo del método se escogió la columna ZORBAX Eclipse, específica para la separación de los HAPs a la que se acopló una pre-columna para alargar su vida útil, rellena con el mismo material específico. Se trabajó siempre a temperatura ambiente.

Las variables optimizadas fueron la longitud de onda de excitación y emisión, la composición de la fase móvil, la velocidad de flujo, la temperatura de trabajo y las variables del detector.

La elección de las distintas longitudes de onda que se probaron se basó en la revisión bibliográfica realizada [47, 54, 101, 102, 105, 108, 120, 338, 341, 347, 350, 353, 359, 360]. Las longitudes de onda recogidas en estos artículos fueron: $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 346/389, 229/400, 265/432, 270/378, 348/388, 347/381, 348/395, 242/390; 242/388, 240/388 nm, respectivamente.

Después de los estudios previos realizados, finalmente se adoptaron como longitudes

de onda de trabajo 242/388 nm, siendo éstas las mismas que utilizaron Jongeneelen et al [20] en sus determinaciones.

La optimización de la fase móvil se realizó de la misma manera, partiendo de la revisión bibliográfica y a un flujo de 1 mL/min. Las principales fases móviles utilizadas contenían ACN/H₂O o MeOH/H₂O en distintas proporciones y gradientes [46, 47, 54, 95, 101, 102, 108, 120, 302, 338, 341, 345, 348, 350, 353, 354, 356, 357]. Primeramente se utilizó la fase móvil compuesta por ACN/H₂O en varias proporciones. Se probaron composiciones en el intervalo creciente de ACN en las siguientes relaciones (v/v): 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0. Los resultados obtenidos en ninguno de ellas fueron considerados adecuados para la determinación el 1OHPyr en estas condiciones.

En otros estudios como el de Beach et al [302] se empleaban mezclas de estos tres disolventes como fase móvil, MeOH:ACN:H₂O, (38:57:5,v/v:v), pero dicha fase móvil, ni otras proporciones ensayadas, modificando las iniciales del estudio, como fueron (90:5:5,v/v:v, 85:7,5:7,5,v/v/v o 95:2,5:2,5,v/v/v), daban como resultado picos cromatográficos cuantificables.

Finalmente, se probó la composición MeOH/H₂O en distintas proporciones crecientes de H₂O. Estas fueron 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 (v/v). En estos ensayos se observó, en coherencia con la naturaleza del analito, que el incremento de agua en la fase móvil hacía retrasar la aparición de los picos.

Se consideró óptima la composición de fase móvil formada por MeOH/H₂O 88:12,v/v, en modo isocrático, también utilizada previamente por otros autores [359].

El siguiente paso fue ajustar la velocidad de flujo para mejorar la resolución. Valores por debajo de 1 mL/min daban señales o picos anchos y mal definidos (velocidades de 0,5 ó 0,8 mL/min), velocidades superiores daban tiempos de retención muy cortos dificultando la

medida con el pico de inyección (velocidades de 1,2 ó 1,4 mL/min). Se optó por el valor de flujo de 1 mL/min al dar una buena resolución y definición de pico para 1OHPyr. En estas condiciones optimizadas el tiempo de retención para el analito fue de 3,2 min.

Por último, se optimizaron las variables del detector de fluorescencia modificando el grado de ganancia del detector para aumentar la señal respecto al ruido. Las ganancias probadas fueron 5, 8, 10 y 12, observándose que la mejor resolución se obtenía con una ganancia del instrumental de 10.

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas óptimas de análisis se procedió a preparar distintas curvas de calibrado para el 1OHPyr en un intervalo entre 0,15 y 2,0 µg/L siendo estudiada la linealidad de tres curvas de calibrado en disolución orgánica (ACN), (Figura 5.2).

Para las muestras sintéticas, la media de la ecuación de la recta fue $y=20,492 x + 9,705$ presentando una buena linealidad con un coeficiente de correlación medio de 0,9705. El límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) obtenidos fueron 0,11 y 0,17 µg/L, respectivamente calculados según recomendación de Miller et al [361] como aquella concentración de analito que produce una señal igual a la media de las señales del blanco más 3 (LOD) ó 10 (LOQ) veces la desviación estándar de la misma. La recta de calibrado se representa en la Figura 5.2.

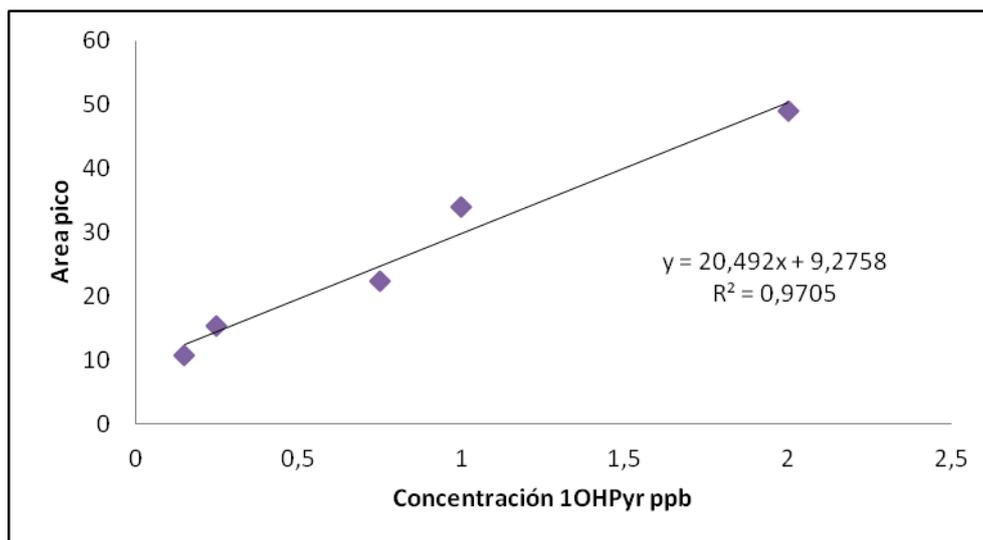


Figura 5.2. Recta de calibrado del 1OHPyr para muestras sintéticas

De igual forma se prepararon curvas de calibrado utilizando muestras de orina dopadas con disolución estándar de 1OHPyr en el mismo intervalo de concentraciones. Previo a su inyección en el cromatógrafo, la muestra fue filtrada empleando un filtro Whatman de un tamaño de poro de 0,45 μm .

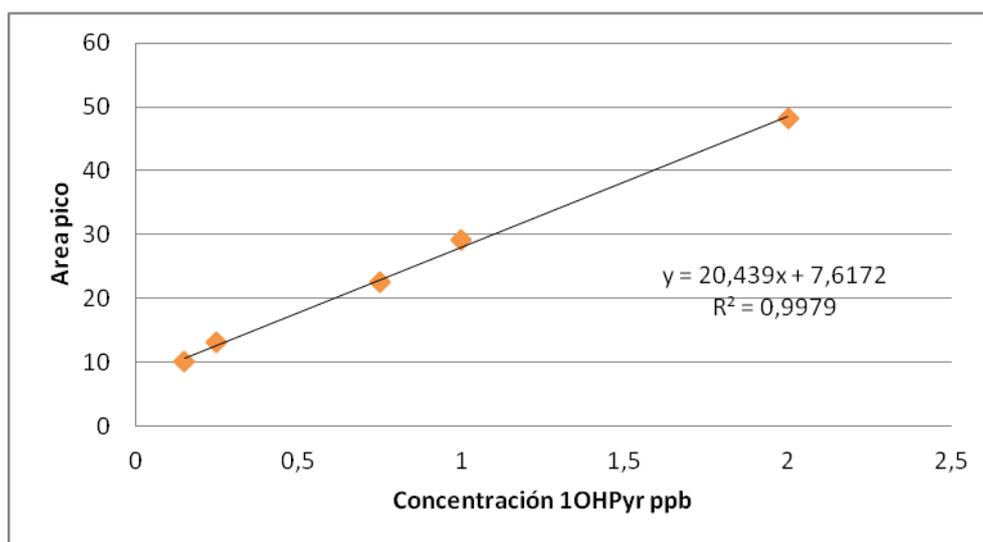


Figura 5.3. Recta de calibrado del 1OHPyr para muestras de orina

En este caso, se obtuvieron los siguientes datos: $y=20,439 x + 7,6172$, presentando una buena linealidad con un coeficiente de correlación medio de 0,9979. El límite de detección

(LOD) y cuantificación (LOQ) fueron calculados siguiendo el mismo procedimiento que el empleado para las muestras sintéticas, siendo éstos 0,05 y 0,17 µg/L respectivamente. De la misma manera se muestra en la Figura 5.3 la recta de calibrado para las muestras de orina.

6. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

6.1. INTRODUCCIÓN

Los polímeros de impresión molecular (MIP) suponen un nuevo enfoque en la preparación de materiales funcionales. Estos polímeros van a ser desarrollados mediante técnicas reproducibles a través de una síntesis no covalente pero siguiendo distintas estrategias de polimerización, dando como resultado polímeros de características distintas cuyo comportamiento será evaluado respecto al analito plantilla.

Basándonos en la bibliografía y en experiencias anteriores, los componentes elegidos para la síntesis de polímeros en los que el 1OHPyr es la plantilla, fueron; MAA como monómero funcional, EGDMA como entrecruzante, AIBN como iniciador de la polimerización y ACN como disolvente. El polímero se sintetizó en este medio para favorecer las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno entre la plantilla y el monómero funcional [232]. Para la elección de estos componentes y sus proporciones se partió del trabajo inicial de Vlatakis et al [131] y de Krupadam et al que emplearon el B[a]Pyr como analito plantilla [362].

6.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

La síntesis de los polímeros se ha llevado a cabo empleando dos estrategias diferentes de polimerización, la polimerización en bloque y la polimerización por precipitación. Se describen a continuación cómo se realizaron dichos procedimientos.

6.2.1. Síntesis de polímeros de impresión molecular en bloque (MIP_{bloque})

Para la síntesis de los polímeros en bloque, que es el procedimiento más utilizado en la síntesis de polímeros de impresión molecular, se utilizó:

- 10 mg de 1OHPyr como plantilla

- 22,3 μL de MAA como monómero funcional
- 350 μL de EGDMA como entrecruzante
- 79,7 mg de AIBN como iniciador de la polimerización
- 0,622 mL de ACN como disolvente o porógeno

La polimerización fue llevada a cabo en un frasco de cristal de 35 mL de capacidad en una relación molar 1:6:40 (1OHPyr/MAA/EDGMA). La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos tras los cuales se incorporaron el iniciador y el porogeno en relación 3:5.

El polímero no impreso ($\text{NIP}_{\text{bloque}}$) fue preparado de la misma manera que el polímero impreso pero en ausencia de plantilla (1OHPyr).

La solución resultante fue purgada con nitrógeno y sonificada durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos para eliminar la presencia de oxígeno que pudiese impedir la polimerización. La mezcla se tapa y protege con papel de aluminio para evitar la posible fotodegradación del analito siendo transferida a un baño termostatzado de silicona a 60 °C durante un periodo de 24 horas. Se eligió la silicona frente al agua para evitar las posibles pérdidas por evaporación. La polimerización, por tanto, se inició térmicamente. Después de esto, el polímero obtenido es mantenido en una estufa atemperada a 60 °C por un periodo de 24 horas.

Tras este proceso, se ha formado un monolito en bloque del polímero que habrá que triturar y tamizar, obteniendo distintos tamaños de partícula. El tamizado se efectuó en húmedo empleando metanol como disolvente, tras lo cual, los polímeros fueron secados en estufa a 60 °C. Dependiendo de la aplicación que se le pretenda dar posteriormente, se escogerá la fracción de tamaño más adecuada a dicha aplicación.

La extracción de la plantilla se ha llevado a cabo empleando un método de extracción por microondas.

Más concretamente, el procedimiento llevado a cabo por Bravo et al en 2005 [363]. En un vaso de muestra *Green Chem*, que contendrá al MIP, se añaden 30 mL de MeOH junto con un agitador magnético para facilitar la extracción. De igual forma se procederá con el NIP. La programación del microondas que permitió la extracción de la plantilla sería la siguiente: se programó el microondas a una potencia de 400 W con una rampa de temperatura durante 5 minutos hasta alcanzar los 100 °C. En ese momento, se mantiene al 85% de su potencia durante 20 minutos más. Una vez transcurrido el proceso, se dejan enfriar los vasos antes de abrirlos hasta alcanzar la temperatura ambiente con la finalidad de evitar riesgos por salpicadura. El MIP y el NIP se recuperan por filtración a vacío, eliminado el disolvente. El procedimiento de extracción se repitió tres veces, comprobando y asegurando de esta manera, la extracción completa de la plantilla.

Tanto el MIP como el NIP se dejaron secar en estufa a 60 °C. Una vez secos, son pesados y empaquetados en cartuchos de SPE de propileno con una capacidad de 1 mL. En este caso y para esta aplicación, se escogió un tamaño de partícula comprendido entre 100-200 μm que se dispuso entre dos fritas de tamaño de poro 20 μm para evitar las pérdidas de polímero durante todo el proceso.

6.2.2. Síntesis de polímeros de impresión molecular por precipitación (MIP_{precip})

Basado igualmente en la polimerización radicalica de monómeros, la polimerización por precipitación siguió el protocolo anteriormente descrito pero con alguna modificación para permitir la precipitación del polímero y la formación de microesferas.

En este caso se emplearon las siguientes cantidades:

- 10 mg de 1OHPyr como plantilla
- 22,3 μ L de MAA como monómero funcional
- 350 μ L de EGDMA como monómero entrecruzante
- 79,7 mg de AIBN como iniciador de la polimerización
- 8,95 mL de ACN como disolvente

Para que la síntesis del polímero por precipitación MIP_{precip} tuviese lugar, se dispuso en un frasco con rosca de 35 mL de capacidad 22,3 μ L de MAA, 350 μ L del monómero entrecruzante EGDMA, y 10 mg del analito plantilla 1OHPyr, siendo su relación, como en el caso anterior plantilla/monómero/entrecruzante de 1:6:40. A diferencia del desarrollo anteriormente descrito, se añadió una barra magnética para permitir y facilitar la agitación de la disolución. Se dejó reposar la mezcla durante 5 minutos. Se añadieron 79,72 mg del iniciador AIBN y 8,95 mL de ACN, de tal forma, que la relación de volúmenes entre los monómeros y el disolvente fuese de 1:24, dándose un exceso de disolvente en la disolución responsable, junto con la agitación, de la formación de microesferas. El frasco se tapó y se cubrió de papel de aluminio.

Paralelamente se preparó el NIP_{precip} , salvo que para preparar el polímero no impreso, no se añadió el 1OHPyr. El polímero así formado, se someterá a los mismos procedimientos que el MIP.

De la misma forma que en la polimerización en bloque, las mezclas de polimerización (MIP_{precip} , NIP_{precip}) se purgaron con nitrógeno, sonicándose en un baño de ultrasonidos. El baño de silicona en este caso se preparó con agitación. Para no interferir en la agitación individual de cada uno de los polímeros, el MIP y el NIP ocuparon baños independientes. El proceso de polimerización se inició térmicamente a una temperatura de 60 °C y una agitación de 100 rpm. Para conseguir esta agitación, al baño también se le añadió una barra magnética

que hizo girar la barra interior del frasco que contenía tanto al MIP_{precip} como al NIP_{precip} . En dicho baño permanecieron durante 24 horas.

Se incluye a continuación en la Figura 6.1 una fotografía tomada en el laboratorio para mostrar cómo se dispusieron las dos barras agitadoras para que la polimerización por precipitación tuviese lugar.

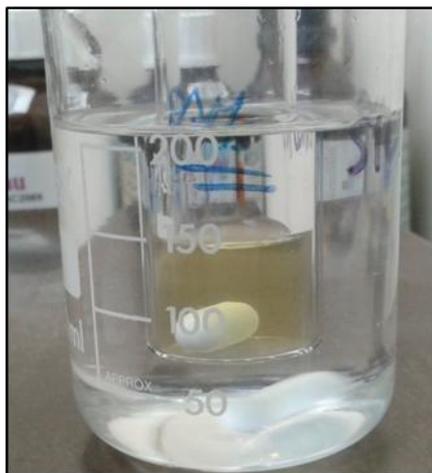


Figura 6.1. *Agitación del MIP_{precip}*

Trascurridas las 24 horas, ambos frascos, (MIP_{precip} , NIP_{precip}) son trasladados a una estufa previamente calentada a una temperatura de 60 °C donde permanecerán otras 24 horas. Pasado este tiempo y finalizada ya la polimerización, se procederá a extraer la plantilla. Se llevó a cabo empleando 80 mL de metanol como disolvente de lavado. La primera dificultad encontrada, derivada del pequeño tamaño de partícula, era que éstas no escapasen del filtro con la consiguiente pérdida del polímero. Se solventó envolviendo la muestra con una malla de 25 μm de tamaño de poro (Nytal, Safer), recubierta a su vez por papel de filtro e introducida en un cartucho de celulosa que se incorporó al sistema Soxhlet. El proceso de extracción continuó hasta que se comprobó que en el disolvente recogido no se detectaba la presencia del 1OHPyr medido en el HPLC-FD. La extracción tuvo una duración de 28 horas, considerablemente mayor a la extracción asistida por microondas del procedimiento anterior.

Finalmente, el polímero es centrifugado filtrado y dejado secar en estufa a 60 °C. Tras pesarlo se obtuvieron 125,8 mg que se incorporaron a un cartucho de SPE de 1 mL entre dos fritas de 20 μm .

6.2.3. Caracterización morfológica. SEM

La morfología del polímero fue examinada con un SEM S-3000N del departamento de Matemáticas, Físicas y Fluidos de la Facultad de Ciencias de la UNED. Las microfotografías obtenidas del polímero MIP_{precip} y NIP_{precip} se tomaron bajo el método de dispersión. En este procedimiento 10 mg de polímero se disolvieron en 4 mL de etanol (96%). La disolución resultante fue trasladada a un baño de ultrasonidos durante 30 segundos para romper los posibles conglomerados formados. Posteriormente, una pequeña cantidad de muestra, unas tres gotas conteniendo partículas diluidas en dispersión, se colocaron sobre un portaobjetos secándose a vacío para poder ser recubiertas por pulverización catódica de Au/Pd (Polaron Range SC7620) debido a la baja conductividad eléctrica de la muestra, necesaria para ser observada por SEM.

6.2.4. Isotermas de adsorción

Los experimentos de adsorción fueron llevados a cabo estudiando las uniones del analito objeto de estudio, 1OHPyr en el MIP y en el NIP sintetizados tanto en bloque como por precipitación. Los experimentos se realizaron en *batch*. Para ello se tomaron 20 mg de cada uno de los polímeros impresos y sus correspondientes no impresos poniéndose en contacto, cada uno de ellos, con 2,5 mL de una disolución que contenía concentraciones crecientes de analito. Estas concentraciones iban desde 0,5 a 60 mg/L de 1OHPyr. La mezcla se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente manteniendo agitación mecánica a 450 rpm para asegurar el equilibrio. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante con una pipeta Pasteur para

posteriormente filtrarlo con ayuda de un filtro Whatman de 0,45 μm de tamaño de poro para evitar introducir partículas en el HPLC-FD. De esta forma se mide la concentración de analito libre que ha quedado en disolución. Por diferencia entre la cantidad de concentración inicial y la que queda libre en el sobrenadante, se puede determinar la cantidad de analito que queda unida al polímero.

La Figura 6.2 muestra un esquema del diseño experimental que se llevó a cabo con los MIP [364].

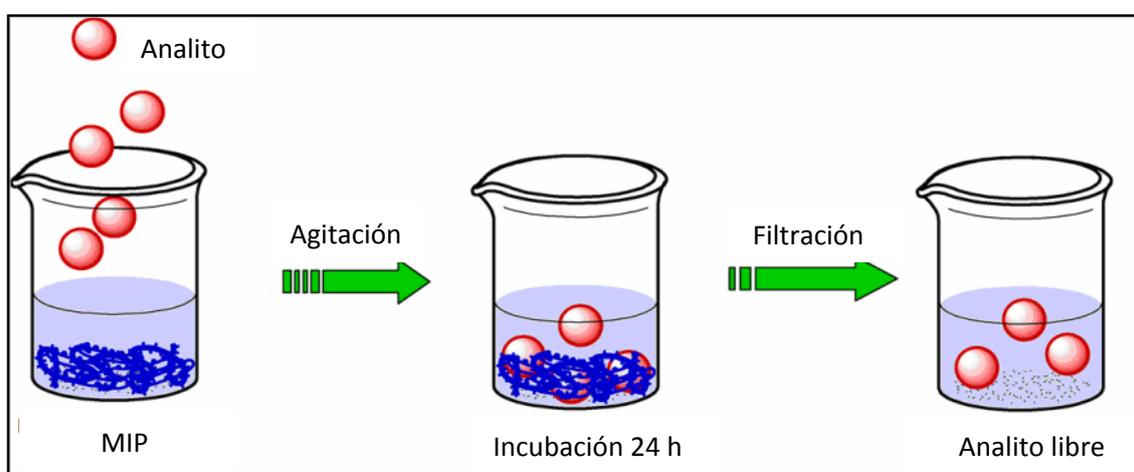


Figura 6.2. Experimento en batch para la caracterización de los MIP [364]

6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.3.1. Síntesis de polímeros

Hasta llegar a los procedimientos desarrollados anteriormente y optimizar el procedimiento de síntesis, se prepararon diferentes polímeros no impresos modificando tanto la proporción y composición de los componentes como el método de inicio de la polimerización.

Primeramente se sintetizó un polímero NIP en bloque iniciando la polimerización con ayuda de radiación ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm durante 24 horas. Se formó un polímero en bloque, pero este procedimiento se descartó por la imposibilidad de incluir

agitación dentro de la lámpara, con lo que no se podía sintetizar el polímero por precipitación con esta instrumentación, optando por la iniciación térmica para la síntesis comparativa de los polímeros.

Debido a la poca cantidad de analito plantilla con la que se partía, se buscaba el mayor rendimiento posible dado con esas proporciones. Se probaron distintas composiciones para la síntesis del NIP. Primeramente se empleó como entrecruzante divinilbenceno DVD-80 y como porógeno una mezcla de ACN:tolueno en proporción 3:1 (v/v). La iniciación de la polimerización fue térmica pero el rendimiento obtenido fue muy escaso.

Para optimizar el exceso de disolvente necesario para conseguir un buen rendimiento en el MIP_{precip.} se tomaron distintas proporciones de ACN con respecto a los monómeros. El rendimiento máximo se obtuvo cuando esta relación fue de 1:24 en volumen con los monómeros. Todos los NIP formados se sometieron a las mismas operaciones que en los casos anteriores sin encontrar un rendimiento óptimo que permitiese su aplicabilidad en el MIP.

Así mismo se optimizó la cantidad de iniciador que mejorase el rendimiento, obteniendo así, mayor cantidad de polímero. Se probaron las relaciones 1:2, 1:3, 1:9, 1:10 y 1:20 respecto al % de monómeros.

De todos estos procesos, los mejores resultados se obtenían con el procedimiento anteriormente descrito en los apartados 6.2.1 y 6.2.2 para el MIP_{bloque} y MIP_{precip.}

La extracción de la molécula molde de los polímeros impresos, se ha llevado a cabo mediante la técnica de extracción asistida por microondas para el caso del polímero impreso en bloque, y mediante un procedimiento de extracción Soxhlet para el caso del polímero impreso por precipitación. Se han empleado dos técnicas diferentes con fines comparativos.

La extracción asistida por microondas (MAE) es una alternativa al procedimiento convencional con Soxhlet ya que mejora los tiempos de extracción y los volúmenes de

disolventes [365]. Las primeras extracciones que empleaban microondas en compuestos orgánicos se llevaron a cabo en 1986 [366]. A partir de ahí, numerosos laboratorios han empleado esta técnica para la extracción de compuestos. Por citar algunos ejemplos, se han obtenido extracciones de HAPs en suelos [367, 368], sedimentos marinos [369], muestras de petróleo [370] o en tejidos [371].

Parámetros como el tiempo, temperatura, potencia, naturaleza tanto del disolvente como de la muestra o la estabilidad de los compuestos, son importantes tenerlos en cuenta a la hora de llevar a cabo una MAE.

La extracción mediante Soxhlet es el procedimiento clásico de extracción. Fue introducido por Soxhlet en 1879 [372].

6.3.2. Caracterización morfológica. SEM

El microscopio electrónico de barrido (SEM o *Scanning Electron Microscope*) es un instrumento capaz de ofrecer un variado rango de información procedente de la superficie de la muestra tanto de materiales orgánicos como inorgánicos. Fue inventado en 1937 por Manfred von Ardenne. En este microscopio se utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen de gran resolución. Es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. La técnica requiere que las muestras sean conductoras. Si no lo son, se recubren con una fina capa de metal como puede ser el oro para conferirles ese carácter conductor. Esta sencilla técnica de preparación de muestra recibe el nombre de “*sputtering*” o pulverización catódica.

Una vez preparada la muestra, el SEM barre la superficie con electrones acelerados a través del cañón del instrumento. Este haz lleva una energía que va desde unos cientos eV hasta unas decenas de keV. El haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de la misma siguiendo una trayectoria de líneas paralelas. Son detectados

mediante lentes basadas en electroimanes midiendo la cantidad e intensidad de electrones que devuelve la muestra.

Se dan dos formas de radiación fundamental. Por una parte los electrones secundarios y por otra los electrones retrodispersados. Los electrones secundarios son de baja energía, del orden de las decenas de eV, resultantes de la emisión por parte de los átomos que constituyen la muestra, siendo los que están más cercanos a la superficie debido a la colisión con el haz incidente. Por otro lado, los electrones retrodispersados son electrones del haz incidente que han interactuado con los átomos de la muestra siendo reflejados. La intensidad de estas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir, depende de la topografía de la muestra.

La señal emitida por los electrones y la radiación resultantes del impacto se recogen mediante un detector y se amplifican para cada posición de la sonda. Las variaciones en la intensidad de la señal que se producen conforme la sonda barre la superficie de la muestra se utiliza para variar la intensidad de la señal en un tubo de rayos catódicos que se desplaza con la sonda, resultando una relación directa entre la posición del haz de electrones y la fluorescencia producida en el tubo de rayos catódicos. El resultado será una imagen topográfica muy ampliada de la muestra [373].

Las Figuras 6.3, 6.4 y 6.5 son microfotografías tomadas con SEM del MIP_{precip}, a distinta resolución del aparato (5, 10 y 30 micras). Como puede observarse, la topografía de la superficie muestra la formación de partículas esféricas independientes de un tamaño homogéneo. La Figura 6.6 muestra el polímero formado por síntesis en bloque.

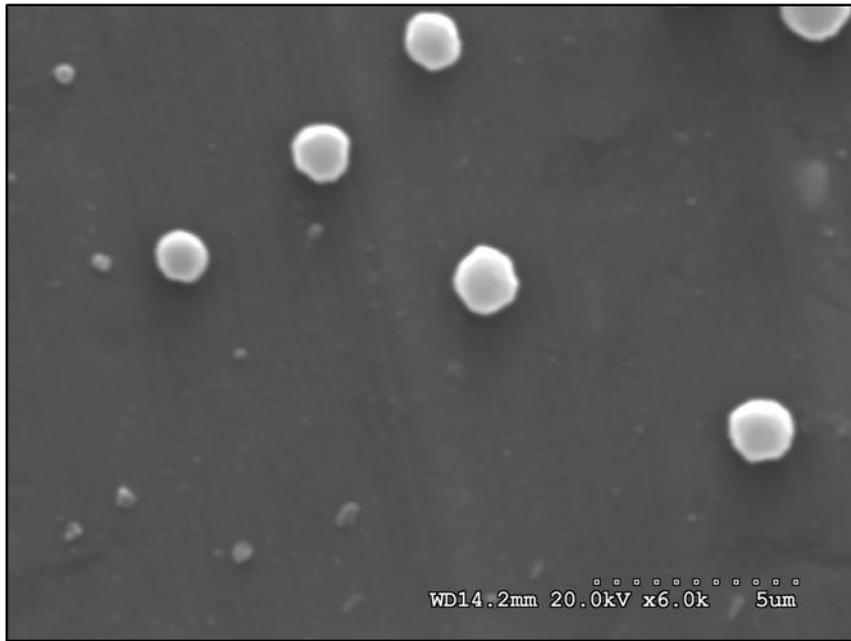


Figura 6.3. Imagen SEM tomada a 5 micras. Polímero sintetizado por precipitación

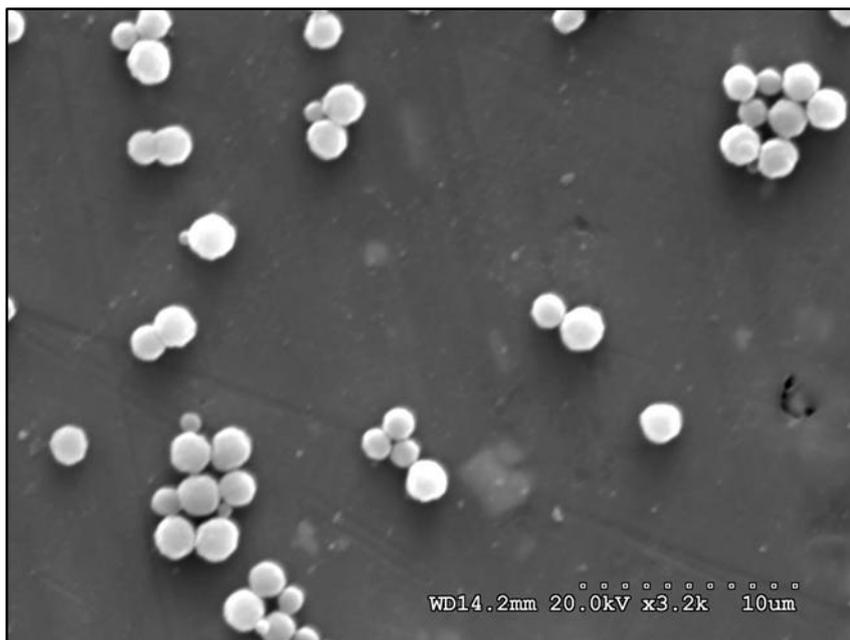


Figura 6.4. Imagen SEM tomada a 10 micras. Polímero sintetizado por precipitación

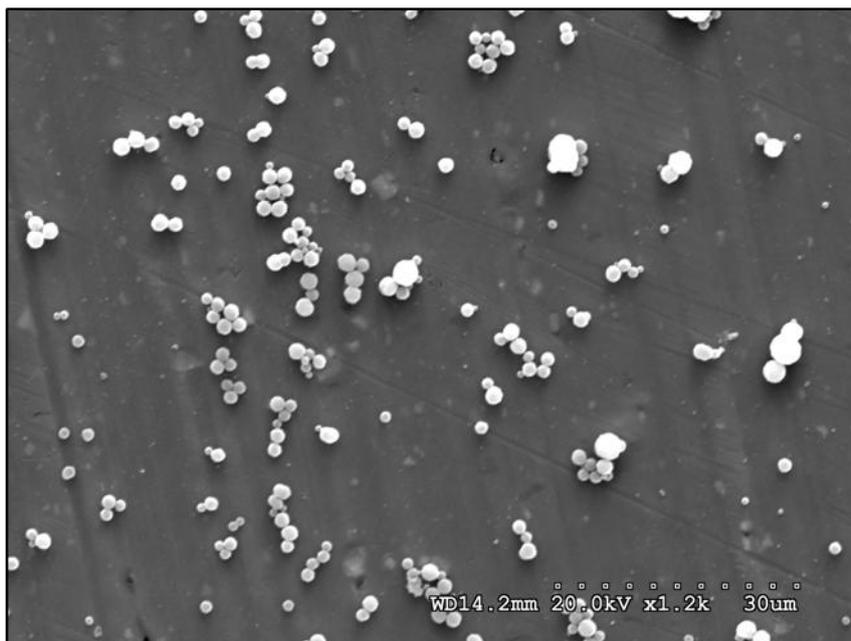


Figura 6.5. Imagen SEM tomada a 30 micras. Polímero sintetizado por precipitación

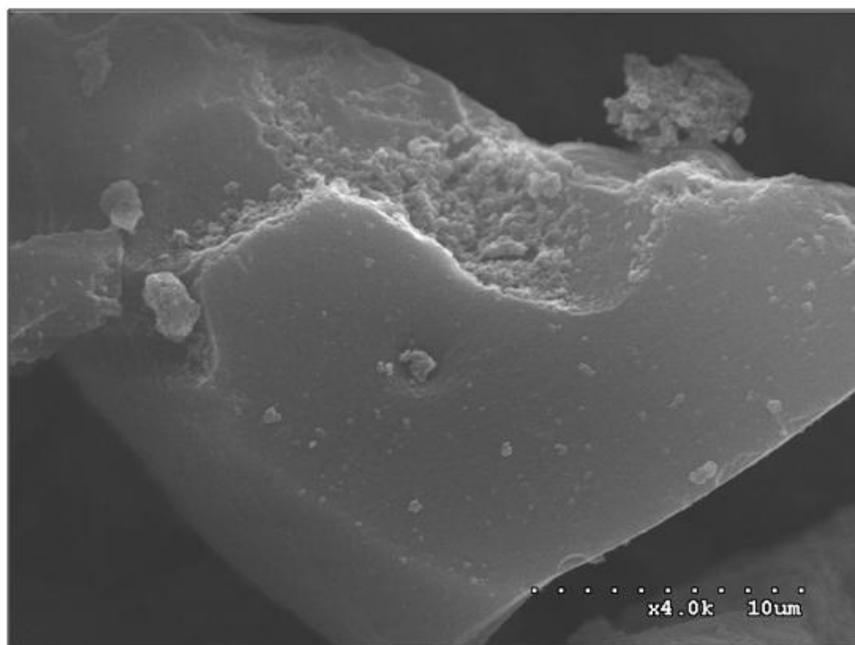


Figura 6.6. Imagen SEM tomada a 10 micras Polímero sintetizado en bloque.

6.3.3. Isotermas de adsorción

Mediante la evaluación de las isotermas de adsorción se obtiene información sobre la selectividad, constante de afinidad y densidad de los sitios de unión del polímero. La evolución de las isotermas de adsorción se lleva a cabo realizando diferentes ensayos destinados a evaluar la cantidad de analito que se une al polímero al cargar concentraciones crecientes del mismo cuando se ha alcanzado el equilibrio termodinámico. El tiempo de incubación, en la mayoría de los ensayos, es el tiempo necesario para que se produzca una unión del 90% del analito en el polímero, que dependerá del sistema y que suele oscilar entre las 2-24 horas. Una vez alcanzado el equilibrio, el polímero se separa por centrifugación y filtración, donde la concentración del analito no unida al polímero puede medirse en el sobrenadante [364].

La capacidad de adsorción Q (mg/g) puede evaluarse entonces por la diferencia entre la concentración inicial del analito y la medida en el sobrenadante (Ecuación 6.1)

$$Q = \frac{(C_o - C_e) V}{W} \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Siendo C_o , la concentración inicial, C_e la concentración en el equilibrio, v el volumen de la disolución y w la masa del polímero.

La construcción de las isotermas de adsorción se llevó a cabo mediante ensayos en *batch*.

La principal dificultad encontrada en estos ensayos fue la poca cantidad de polímero sintetizada que impedía realizar el experimento con todas las concentraciones a la vez. El experimento tuvo entonces lugar en varias etapas, asegurando la completa limpieza del polímero con respecto a la concentración del 1OHPyr.

Para llevar a cabo los experimentos en *batch* primeramente se necesitaba una recta de calibrado que incluyese las concentraciones de trabajo. Esta recta presentaba linealidad en el intervalo 0,5-60 ppm y fue la siguiente: $y = 100,36 + 253,82x$, con una R^2 de 0,9911.

Para el primer punto de las isothermas, se tomaron 20 mg de cada polímero, es decir 20 mg de cada uno de estos polímeros MIP_{precip} , NIP_{precip} , MIP_{bloque} , NIP_{bloque} , en 2,5 mL de disolución que contenía 0,5 ppm de 10HPyr. La mezcla se mantuvo cubierta por papel de aluminio, para evitar la posible fotodegradación del analito, durante 24 horas con agitación a 450 rpm. Trascurrido este tiempo, cada una de las cuatro mezclas fue centrifugada durante 5 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante previamente filtrado fue analizado con ayuda del HPLC para medir la cantidad de 10HPyr presente. Por diferencia, se llegará a conocer la cantidad de analito unida al polímero.

Los cálculos efectuados fueron los siguientes;

$$mg\ 10HPyr\ iniciales = 0,5 \frac{mg}{L} \times 2,5 \times 10^{-3} L = 1,25 \times 10^{-3} mg$$

$$mg\ 10HPyr\ sobrenadante = 0$$

$$mg\ 10HPyr\ adsorbidos = 1,25 \times 10^{-3} mg$$

$$Q = mg\ 10HPyr\ ads/g\ MIP = 1,25 \times 10^{-3} mg / 0,02 g = 0,0625 mg/g$$

Procediendo de igual forma con las siguientes concentraciones de 10HPyr se obtienen los datos mostrados en la Tabla 6.1 para los polímeros en bloque.

Tabla 6.1. Datos experimentales MIP_{bloque} y NIP_{bloque} para el 1OHPyr

Ce (mg/L)	MIP_{bloque} -Q(mg/g)	NIP_{bloque} -Q(mg/g)
0	0	0
0,5	0,0625	0,0625
1	0,0833	0,1250
2,5	0,2474	0,1411
5	0,3414	0,1205
10	0,5260	0,1364
20	1,2722	0,2605
30	1,7805	0,4347
40	2,0975	0,6337
50	2,1364	0,8527
60	2,1219	0,8426

Lo primero que puede deducirse a la vista de estos datos es que la máxima capacidad de adsorción de las partículas del MIP tiene un valor de 2,14 mg/g mucho más alta que la de las partículas del NIP, siendo este último valor de 0,85 mg/g.

Si se representa el valor de Q (mg/g) frente a C_e (mg/L) se obtiene la Figura 6.7 que muestra los datos experimentales de adsorción para el MIP y NIP sintetizados en bloque para el 1OHPyr.

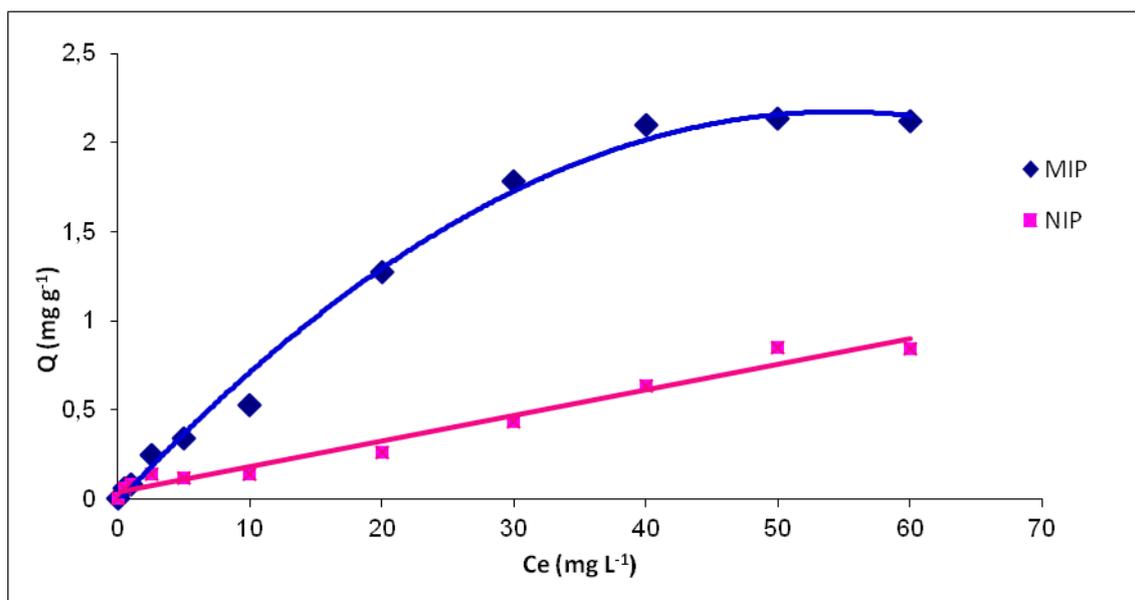


Figura 6.7. Representación gráfica de los datos experimentales MIP_{bloque} y NIP_{bloque} para el 1OHPyr

Para evaluar el grado de impresión, se define el factor de impresión según la ecuación 6.2.

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \text{ (Ecuación 6.2)}$$

Dando, en este caso, un valor de 2,5. IF es una medida de la fuerza de interacción del polímero impreso hacia el analito plantilla. Con este valor se ha demostrado que existe una correlación positiva del factor de impresión, lo que significa, por tanto, un buen rendimiento de impresión. Los sitios formados en la estructura deberían interactuar fuertemente con la molécula molde y, de este modo, permitir una mayor retención en relación con el polímero no impreso [374].

Los mismos cálculos se realizan con el MIP_{precip} y NIP_{precip} . Los datos experimentales para ambos polímeros son los dados en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Datos experimentales MIP_{precip} y NIP_{precip} para el 1OHPyr

Ce (mg/L)	MIP_{precip} -Q(mg/g)	NIP_{precip} -Q(mg/g)
0	0	0
0,5	0,0625	0,0625
1	0,1741	0,1250
2,5	0,2524	0,1411
5	0,3884	0,1243
10	0,6426	0,2583
20	1,2589	0,4623
30	2,1303	0,5669
40	2,6359	0,8623
50	2,6544	1,0638
60	2,6521	1,3794

La máxima capacidad de adsorción de las partículas del MIP tiene un valor de 2,65 mg/g mucho más alta que la de las partículas del NIP, siendo este último valor de 1,38 mg/g. A su vez, estos valores son mucho más altos que los obtenidos con los polímeros en bloque, siendo por tanto su capacidad de adsorción mucho mayor.

Si se representa el valor de Q (mg/g) frente a C_e (mg/L) se obtiene la Figura 6.8 que muestra los datos experimentales de adsorción para el MIP y NIP sintetizados para el 1OHPyr.

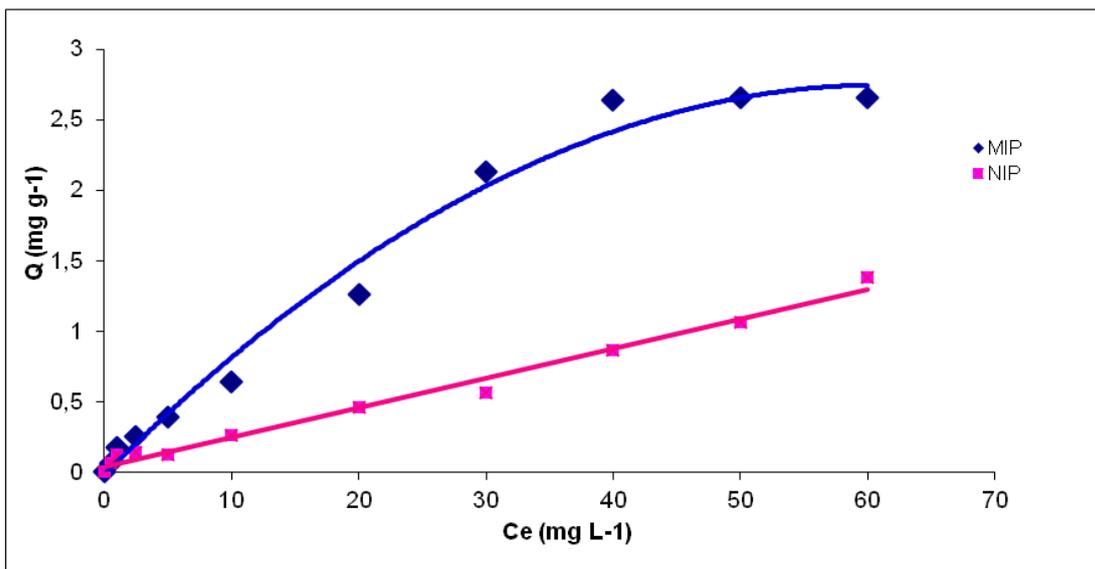


Figura 6.8. Representación gráfica de los datos experimentales MIP_{precip} y NIP_{precip} para el 1OHPyr

En este caso el factor de impresión (Ecuación 6.2), tiene un valor de 1,92. Con este valor se ha demostrado que existe una correlación positiva del factor de impresión, lo que se traduce en un buen rendimiento de impresión.

Si en ambos casos se representa Q/C , siendo C la concentración de analito unido, frente a Q , se obtiene la ecuación de Scatchard representada por la ecuación 6.3.

$$\frac{Q}{C} = \frac{(Q_{max} - Q)}{K_d} = \left(\frac{1}{K_d}\right) \times Q + \frac{Q_{max}}{K_d} \quad (\text{Ecuación 6.3})$$

Donde K_d y $Q_{m\acute{a}x}$ son las constantes de disociación y el número máximo de sitios de unión respectivamente.

La representación gráfica de la ecuación de Scatchard para el MIP_{bloque} puede verse en la Figura 6.9, donde se observa que no se obtiene una línea recta.

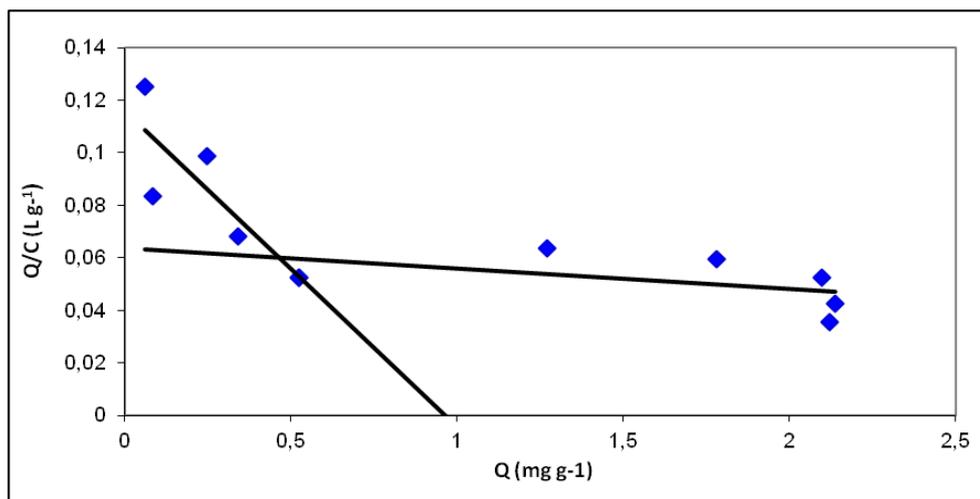


Figura 6.9. Representación de la ecuación de Scatchard para el MIP_{bloque}

Si el ajuste por Scatchard se hubiese ajustado a una recta significaría que el MIP presentaría una distribución homogénea y un único tipo de sitios de unión. Los puntos pueden ajustarse a dos líneas rectas como puede verse en la Figura 6.9. Por lo tanto se presentan en este caso, sitios de unión heterogéneos donde existen al menos dos clases de sitios de unión entre el MIP y el analito [177]. La representación gráfica de la ecuación de Scatchard para la síntesis por precipitación puede verse en la Figura 6.10.

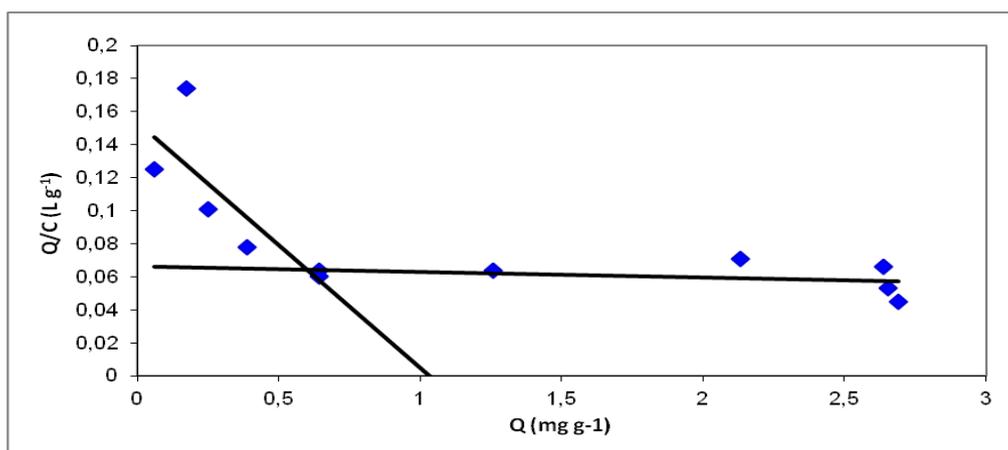


Figura 6.10. Representación de la ecuación de Scatchard para el MIP_{precip}

Como en el caso anterior, la representación de Scatchard devuelve dos pendientes ajustables a dos líneas rectas, lo que indicaría que existen sitios de unión heterogéneos entre el analito y el polímero.

Para explicar estos resultados se han utilizado diferentes modelos de isothermas de adsorción con objeto de caracterizar las propiedades de enlace de los MIP [375]. Principalmente suelen emplearse dos modelos, el de las isothermas de Langmuir y las de Freundlich. Estos modelos son útiles para predecir y comparar el rendimiento de la adsorción.

En este trabajo se van a emplear ambos modelos para analizar la adsorción de los MIP_{bloque} y $MIP_{\text{precip.}}$.

El primero de estos modelos, el modelo de las isothermas de Langmuir, simplifica la distribución de los sitios de unión en un número finito de sitios, asumiendo que sólo hay un tipo de sitios de unión. Este modelo supone:

1. No puede formarse más de una monocapa de moléculas adsorbidas.
2. Todos los sitios de enlace disponibles en el MIP son energéticamente equivalentes y pueden acomodar una molécula de analito.
3. La habilidad del analito para adsorberse a un determinado sitio del MIP no depende de la ocupación de los sitios adyacentes.

Por lo tanto, cuando el analito ocupe un sitio en el MIP, no habrá ninguna adsorción en ese mismo sitio, por lo que se alcanzará el valor de saturación cuando no pueda haber más adsorción de analito, calculándose, por tanto, la capacidad máxima de enlace superficial del polímero.

El modelo de Langmuir se ajusta a la ecuación 6.4 expresada en forma lineal:

$$\frac{1}{Q} = \left[\frac{1}{Q_{max}K_L} \right] \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_{max}} \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde:

- C_e es la concentración de analito en equilibrio expresado en mg/L
- Q capacidad de adsorción expresada en mg/g
- Q_{max} (mg/g) y K_L (L/mg) constantes relacionadas con la energía y entalpia de adsorción, respectivamente

Los modelos de enlace continuo consideran al MIP como un sistema heterogéneo, con sitios de unión de afinidad y selectividad variable en el que se asume que la superficie del adsorbente es energéticamente heterogénea, conformada por grupos de sitios de adsorción de energía característica. El modelo de la isoterma de Freundlich considera sitios de unión heterogéneos basados en la idea de que la adsorción depende de la energía de los sitios de adsorción. De igual forma, la expresión lineal de la ecuación de la isoterma de Freundlich es la representada en la ecuación 6.5.

$$\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Ecuación 6.5})$$

La isoterma de Freundlich se presenta como un modelo empírico donde Q representa la cantidad adsorbida por cantidad de adsorbente en el equilibrio, C_e es la concentración de equilibrio, K_F y n son constantes de Freundlich que dependen de la capacidad de adsorción del adsorbato y la intensidad de adsorción del adsorbente, respectivamente. El valor de n representa el índice de heterogeneidad, donde $n=1$ indica la heterogeneidad de la superficie del adsorbente, aunque la situación más común es $n>1$ debido a la distribución de los sitios en

la superficie. Esto hace disminuir la interacción adsorbente-adsorbato con el incremento de la densidad en la superficie [375].

El ajuste matemático de los datos experimentales se ha realizado a través del programa Origin Pro v 8.0 software of OriginLab Corp (Northampton, UK). A continuación, en la Tabla 6.3 se muestran los valores devueltos por dicho programa tanto para la isoterma de Langmuir como para la de Freundlich para los dos polímeros, el impreso y no impreso sintetizado en bloque. Los errores estándar (SE) para cada parámetro se utilizaron para medir la bondad del ajuste. No obstante, se incluye además el coeficiente de correlación (R^2) para determinar la isoterma de mejor ajuste a los datos experimentales.

Tabla 6.3. Parámetros obtenidos por ajuste no lineal de las isotermas de Langmuir y Freundlich para MIP_{bloque} y NIP_{bloque}

Modelo	Parámetros	MIP_{bloque}		NIP_{bloque}	
		Valor	SE	Valor	SE
Langmuir	$a=1/Q_{\text{máx}}$	0,760	0,467	3,383	0,885
	$b=1/(K_L Q_{\text{máx}})$	8,313	0,647	7,021	1,225
	R^2	0,948	-	0,779	-
Freundlich	$a=\log K_F$	-0,997	0,038	-1,141	0,080
	$b=1/n$	0,794	0,023	0,539	0,066
	R^2	0,985	-	0,876	-

Donde los valores para el MIP_{bloque} son $Q_{\text{máx}}= 1,32$ mg/g, $K_L =0,09$ L/mg con una $R^2=0,948$.

Donde los valores para el NIP_{bloque} son $Q_{\text{máx}}= 0,30$ mg/g, $K_L =0,48$ L/mg con una $R^2=0,779$.

Los resultados muestran como el valor de $Q_{m\acute{a}x}$ en el caso del MIP es mucho más alto que el correspondiente NIP.

En el caso del modelo de Freundlich los valores obtenidos son los siguientes:

Para el MIP_{bloque} son $K_F = 0,100$ y $n = 1,26$ con una $R^2=0,985$.

Para el NIP_{bloque} son $K_F = 0,072$ y $n = 1,85$ con una $R^2=0,876$. El modelo de Freundlich considera las superficies heterogéneas, basado en la idea de que la adsorción depende de la energía de adsorción de los sitios individuales.

Los resultados revelan que el modelo de Freundlich es el que más se ajusta a la distribución de afinidades entre el analito y el polímero de acuerdo con los coeficientes de correlación, describiendo una relación no lineal de adsorción reversible que puede darse en múltiples capas suponiendo la heterogeneidad energética de la superficie de unión [376].

En el caso de los polímeros sintetizados por precipitación, los datos experimentales se llevan al software Origin para realizar el ajuste para ambos modelos de isotermas, dando unos valores representados en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Parámetros obtenidos por ajuste no lineal de las isotermas de Langmuir y Freundlich para MIP_{precip} y NIP_{precip}

Modelo	Parámetros	MIP _{precip}		NIP _{precip}	
		Valor	SE	Valor	SE
Langmuir	$a=1/ Q_{m\acute{a}x}$	0,3746	0,3237	2,307	0,759
	$b=1/(K_L Q_{m\acute{a}x})$	7,4090	0,4483	6,9381	1,51
	R^2	0,96799	-	0,8255	-
Freundlich	$a=\log K_F$	0,898	0,042	1,0739	0,0721
	$b=1/n$	0,779	0,035	0,6017	0,605
	R^2	0,9821	-	0,91588	-

Donde los valores para el MIP_{precip} son $Q_{\text{máx}} = 2,67$, mg/g, $K_L = 0,050$ L/mg con una $R^2=0,96799$.

Donde los valores para el NIP_{bloque} son $Q_{\text{máx}} = 0,433$ mg/g, $K_L = 0,332$ L/mg con una $R^2=0,8255$.

Los resultados muestran como el valor de $Q_{\text{máx}}$ en el caso del MIP es mucho más alto que el correspondiente NIP, y estos a su vez, mucho más altos que en los polímeros en bloque.

Los datos devueltos para el modelo de Freundlich son los siguientes:

Donde los valores para el MIP_{bloque} son $K_F = 0,1$ y $n = 1,28$ con una $R^2=0.9821$

Donde los valores para el NIP_{bloque} son $K_F = 0,1$ y $n = 1,65$ con una $R^2=0,9159$

Como en el caso anterior, los resultados revelan que el modelo de Freundlich es el que más se ajusta a la distribución de afinidades entre el analito y el polímero.

6.4. CONCLUSIONES

De este primer estudio desarrollado en la presente memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Este tipo de polimerización presenta varias ventajas frente a la síntesis del polímero en bloque muy útiles en el caso de los HAPs. Lo más destacado es que se minimiza la manipulación del polímero, se eliminan la necesidad de triturar y tamizar el polímero, muy conveniente cuando se quiere un contacto mínimo con la muestra, debido por ejemplo a la toxicidad de la misma. Al no triturar el polímero se disminuyen las pérdidas por manipulación, además de preservar las cavidades formadas en el polímero que posteriormente albergarán al analito a determinar.
- En lo que se refiere a las isothermas de adsorción, el mejor modelo que caracteriza la unión entre el MIP y el 1OHPyr es el modelo de Freundlich, siendo una buena

aproximación a la descripción del mecanismo de adsorción presente en la mayoría de los polímeros de impresión molecular. Los sitios de unión de los MIP exhiben heterogeneidad en los sitios de unión con dos constantes de disociación.

- Se ha comparado la capacidad de unión de los distintos MIP sintetizados llegando a la conclusión de que el MIP realizado por precipitación presenta mayor capacidad de unión que el MIP sintetizado en bloque. Esto puede ser debido en primera aproximación a la ruptura de los sitios de unión cuando el monolito de polímero formado es triturado, rompiendo en ese proceso sitios de unión con el analito.
- La geometría de las partículas de MIP sintetizado por precipitación presentaría una superficie más homogénea para la unión del analito.
- El MIP_{precip} presenta valores de $Q_{máx}$ mucho más elevadas que el MIP_{bloque} . Este resultado puede ser atribuido a mayores y mejores sitios de unión que pueden interaccionar con el analito, presentando una distribución más homogénea de sitios de unión que los aportados por el MIP formado en bloque, siendo además mayor su capacidad de adsorción, resultado de su mayor K_F . Como era de esperar, la polimerización por precipitación parecer ser uno de los métodos de polimerización que da lugar a una distribución de sitios de unión más homogéneos [377, 378].
- En ambos casos, tanto la síntesis por precipitación como en bloque, el MIP puede unir mayor concentración de 10HPyr que el NIP. Inicialmente el MIP puede unir una concentración creciente del analito hasta que llega un momento que se satura y no admite mayor cantidad. La adsorción del MIP no es lineal, sino que sigue una isoterma. Comparando polímero impreso con el no impreso, para la misma cantidad de polímero, a la misma concentración de analito, el porcentaje de enlace en el NIP es mucho menor que en el MIP, por lo tanto puede decirse que la retención del 10HPyr en el MIP es específica, es decir, se debe a la existencia de sitios de unión específicos para los que fueron diseñados.

Derivado de estas conclusiones, el MIP_{precip} ha sido utilizado para el desarrollo de los distintos tratamientos de muestra en esta Tesis Doctoral.

7. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA EL 1-HIDROXIPIRENO

7.1. INTRODUCCIÓN

La demanda actual de métodos analíticos que respondan de forma rápida, a un coste asumible siendo a su vez sensibles, selectivos, y adecuados a las concentraciones requeridas, supone un gran reto dentro de la Química Analítica. La variedad de las muestras en las que se encuentran los compuestos orgánicos de interés, las distintas características físico-químicas de los compuestos, unido a que los detectores disponibles y específicos no son muy numerosos, hace que una de las etapas más importantes del análisis sea la preparación de la muestra. Ésta tiene como finalidad la separación de los analitos de la matriz y de otras sustancias interferentes. Esta etapa engloba por lo general la extracción, la preconcentración y la limpieza de la muestra.

El tratamiento de la muestra mejora la sensibilidad reduciendo las interferencias de la matriz. Este paso previo a veces permite y posibilita detectar analitos a niveles de trazas o ultra trazas. Uno de los procedimientos más utilizados en la preparación de la muestra es la extracción en fase sólida o SPE [236, 238, 239]. Esta técnica permite que el análisis pueda llevarse a cabo de manera rápida, aumentando a la vez la selectividad y por tanto la sensibilidad del análisis. También, permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. En resumen, entre sus ventajas destacan su versatilidad, reducido consumo tanto de disolventes como de volumen de muestra, disminución de costes, tiempos de análisis cortos, resaltando la disminución de la manipulación de muestra debido a que la preconcentración, extracción y limpieza se dan en un mismo proceso.

El procedimiento SPE está basado en la diferente afinidad del analito entre una fase sólida o sorbente y una líquida que será la muestra. El adsorbente debe tener una gran capacidad de adsorción, una rápida cinética de adsorción/desorción y una alta selectividad por el analito. Esta es la razón por la que uno de los factores clave al llevar a cabo una extracción efectiva de los analitos sea la elección adecuada del soporte sólido o adsorbente sobre el que se va a realizar la extracción. El tipo de sorbente vendrá determinado por el analito que se quiera determinar, y que puede presentarse empaquetado en un cartucho, sobre un disco, en una fibra (microextracción en fase sólida, SPME) [267, 268], o sobre barra agitadora (SBSE) [272, 360]. La tendencia actual en la SPE está dirigida a la búsqueda de nuevos soportes y de nuevos sorbentes [108, 120, 266, 345, 350, 379]. Entre ellos se pueden destacar las sílices entrelazadas, carbón grafitado [380], materiales poliméricos [381], inmunosorbentes o como sería en el caso del presente trabajo, polímeros de impresión molecular.

La utilización de los MIP como sorbentes selectivos en SPE (MISPE) fue iniciada por Sellergen en 1994 [203]. En las últimas décadas se han incrementado las publicaciones que incluyen el uso de los MIP como materiales selectivos para la extracción en fase sólida y otros tratamientos de muestra [135, 137]. Comparado con los adsorbentes tradicionales, los MIP han demostrado ser más efectivos y han podido ser aplicados satisfactoriamente al aislamiento y preconcentración de los analitos en alimentos, muestras biológicas y ambientales en los últimos años. Numerosas aplicaciones han demostrado que el MISPE es un método rápido y efectivo para la limpieza y la extracción directa de componentes a nivel de trazas en matrices complejas. Además de tratarse de un material altamente selectivo, la síntesis del mismo es sencilla y económica, permitiendo la creación de materiales con gran capacidad de reconocimiento. Esto explica su interés y desarrollo en el campo de la Química Analítica y en su comercialización. Su robustez físico-química ofrece también la oportunidad de reutilización en numerosas aplicaciones SPE [135, 137, 142, 382].

Por otra parte, se ha demostrado que diferentes estrategias de polimerización pueden mejorar la eficiencia de los MIP. La polimerización en bloque es el método más habitual en la preparación de los polímeros, sin embargo, es necesario triturar y tamizar el polímero para generar partículas con un tamaño de uso apropiado. Este proceso afecta a los sitios de impresión del polímero, presentando huecos de unión heterogéneos y limitando su aplicabilidad [135, 383]. Sin embargo, la polimerización por precipitación, además de eliminar la etapa de trituración y tamizado en la preparación del polímero, da como resultado partículas más pequeñas y homogéneas que presentan mayor superficie de interacción con los analitos.

El proceso de extracción en fase sólida sobre MIP sigue las mismas pautas que cualquier otro procedimiento de SPE. Es decir, una vez retenido selectivamente el analito en el sorbente elegido, los compuestos interferentes pueden ser eliminados mediante la utilización de disolventes o mezclas de disolventes adecuados, siendo el analito posteriormente desorbido o eluído de igual forma, con otros disolventes que faciliten esa desorción. De esta manera se consigue aislar el analito de la matriz.

La eficacia de la extracción puede mejorarse mediante la optimización de las variables experimentales que afectan a dicho proceso. El diseño del procedimiento vendrá dado por la optimización de múltiples variables como pueden ser la selección del empaquetamiento, de la muestra, del volumen de la muestra, los volúmenes de extracción y desorción y los disolventes empleados en las distintas etapas.

A pesar de que nuevas estrategias y soportes se han diseñado para la extracción en fase sólida, los cartuchos de extracción siguen siendo los más utilizados. Un cartucho SPE consiste en una columna de plástico desechable rellena de un material sólido sorbente mantenido entre dos discos porosos (fritas) para evitar pérdidas. La muestra (pretratada o no) se hace pasar a través del cartucho SPE donde se encuentra el material sorbente quedando el

analito adsorbido y/o absorbido sobre él. Una vez retenido selectivamente el analito en el material sorbente empaquetado, los compuestos interferentes son eliminados en la etapa de lavado mediante los disolventes adecuados. De igual forma, los analitos son arrastrados en la etapa de elución mediante la utilización de disolventes o mezclas de disolventes que facilitan esa desorción quedando el analito en el eluato y por tanto extraído de la matriz.

Las diferentes etapas de un proceso SPE en cartucho pueden consultarse en la Figura 7.1 [384].

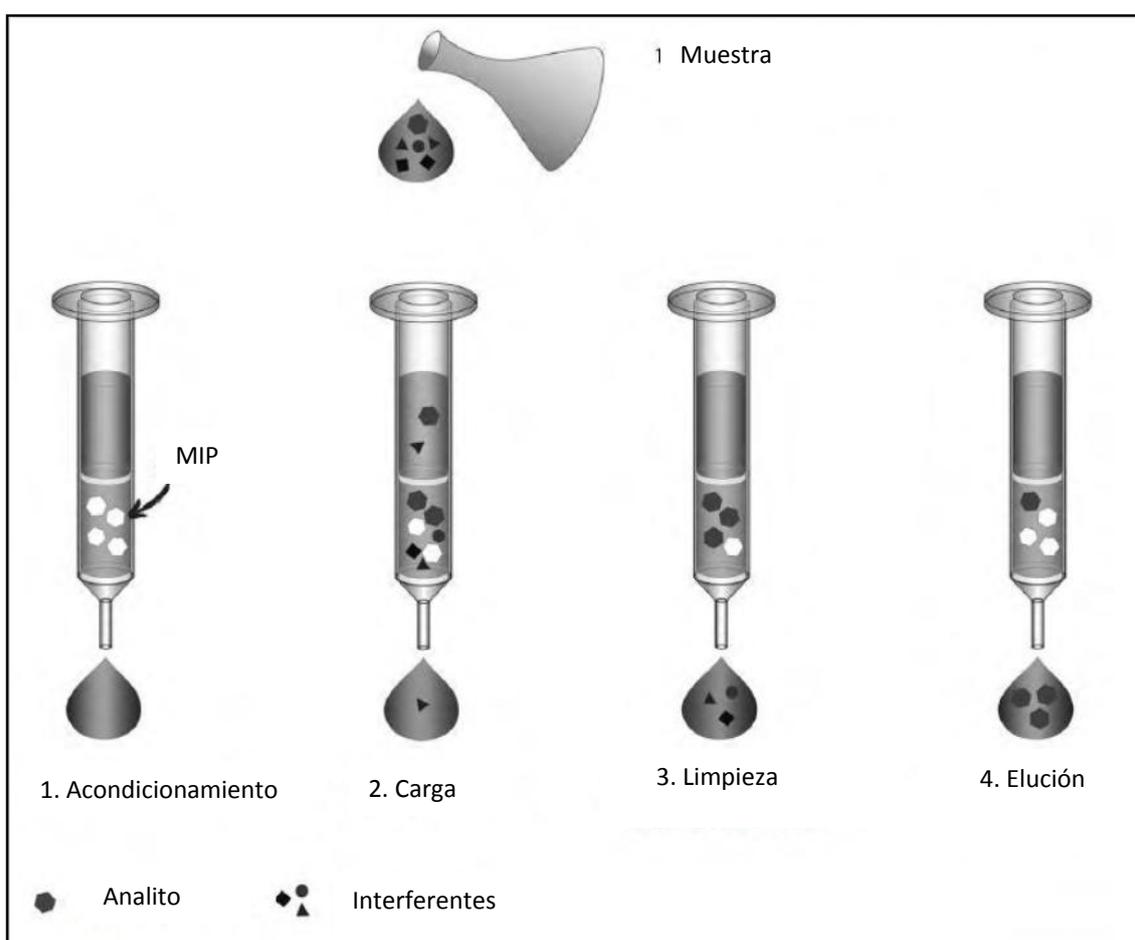


Figura 7.1. Etapas de un proceso SPE

En el presente trabajo se prepararán diferentes cartuchos de extracción en fase sólida utilizando los polímeros de impresión molecular sintetizados (en bloque y por precipitación) y sus respectivos blancos (NIP). Se optimizarán los procedimientos SPE para ellos, demostrando

la selectividad de los MIP frente a los NIP. Esta metodología será validada para muestras de orina. También se realizará un estudio de interferencias utilizando para ello cuatro isómeros hidroxilados del fenantreno. Posteriormente, se realizará un estudio comparativo de los distintos procedimientos MISPE validados con un cartucho de extracción C-18 comercializado.

7.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

7.2.1. Procedimientos MISPE

Preparación de los cartuchos

Los MIP y NIP sintetizados (en bloque y por precipitación) fueron empaquetados en cartuchos de polipropileno para SPE de 1 mL de capacidad entre dos fritas de 20 μm . La cantidad introducida en los cartuchos, tanto de MIP como de NIP fue de 125,8 mg. Para los polímeros sintetizados en bloque se escogió una fracción de tamaño de partícula comprendida entre los 100 y 200 μm .

Los cartuchos así preparados se limpiaron y secaron colocándose en un sistema de vacío.

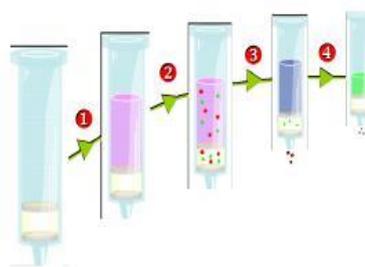
Optimización de los procedimientos MISPE

Las diferentes etapas del proceso SPE, acondicionamiento, carga, lavado y elución fueron optimizadas. Para los polímeros sintetizados por precipitación ($\text{MIP}_{\text{precip}}$ y $\text{NIP}_{\text{precip}}$) estas condiciones se consiguieron acondicionado el cartucho con 800 μL de ACN. Esta etapa es previa a la carga del analito y principalmente se lleva a cabo en el mismo disolvente donde va a ir disuelta la muestra. Posteriormente se cargaron 200 μL de una disolución estándar de 0,25 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr en ACN. La carga permite entonces la fijación selectiva de los analitos en las cavidades, la retención ocurrirá por reconocimiento molecular entre el analito y el polímero. El analito irá disuelto en el disolvente que favorezca la interacción entre los analitos y el polímero

y generalmente suele ser el porógeno. Tras la retención selectiva de los analitos se llevará a cabo un proceso de lavado, para eliminar aquellos interferentes que hayan podido quedar retenidos de forma inespecífica en la matriz polimérica sin que se pierdan en esta etapa los analitos de interés. La etapa de lavado se realizó con 100 μL de una mezcla ACN/ H_2O (95:5, v/v). Por último, en la etapa de elución, los analitos son extraídos del cartucho con el disolvente más apropiado capaz de destruir la interacción formada entre el analito y el polímero en las cavidades del mismo. Habrá que tener en cuenta la solubilidad del analito, el tipo de adsorbente, la polaridad de los analitos y el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero. Por último habrá que tener en cuenta que el disolvente ha de ser compatible con la técnica de detección y análisis posterior. El analito retenido en el cartucho fue eluido empleando 4 x 100 μL de una mezcla MeOH/diclorometano (DCM) (85:15, v/v). Las distintas disoluciones fueron añadidas al cartucho bajo condiciones de vacío. Las fracciones correspondientes fueron recolectadas y secadas bajo corriente suave de nitrógeno a temperatura ambiente. Los residuos fueron reconstituidos con el volumen adecuado de ACN previo al análisis mediante HPLC-FD. La Tabla 7.1 esquematiza las condiciones optimizadas para los MIP obtenidos mediante síntesis por precipitación.

Tabla 7.1. Condiciones MISPE_{precip} optimizadas para el 1OHPyr

ETAPA	DISOLVENTE (μL)
Carga	ACN 200
Limpieza	ACN: H_2O (95:5,v/v) 100
Elución	MeOH:DCM (85:15,v/v) 100 x 4

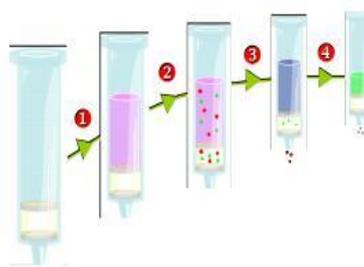


Para los polímeros obtenidos por síntesis en bloque, se realizó el mismo procedimiento, con alguna variación para adaptarlo a sus características específicas. Se acondicionó con 800 μL de ACN. La carga se realizó con 150 μL de 1OHPyr a una concentración

de 0,25 µg/L en ACN. La etapa de limpieza se efectuó con 100 µL de una mezcla de disolvente de lavado ACN:H₂O a una composición de (95:5, v/v). También se utilizó una mezcla MeOH:DCM (85:15, v/v) para la elución. En este caso, la máxima recuperación se obtuvo utilizando volúmenes de 100 µL en tres etapas (3 x 100 µL). La Tabla 3.2 resume las condiciones óptimas para la extracción del 1OHPyr en el procedimiento MISPE realizado con los polímeros sintetizados en bloque.

Tabla 7.2. Condiciones MISPE_{bloque} optimizadas para el 1OHPyr

ETAPA	DISOLVENTE (µL)
Carga	ACN
	150
Limpieza	ACN:H ₂ O (95:5,v/v)
	100
Elución	MeOH:DCM (85:15,v/v)
	100 x 3



Los procedimientos optimizados fueron aplicados a muestras de orina libre de HAPs dopadas a distintas concentración de la disolución estándar de 1OHPyr. Estas concentraciones fueron 0,15 µg/L, 0,25 µg/L y 2,00 µg/L.

7.2.2. SPE con C-18

El proceso SPE también se realizó empleando otro adsorbente, esta vez un cartucho comercial de la marca Symta de 1 mL de capacidad y relleno con el material C-18. Este tipo de rellenos es uno de los más habituales en los procedimientos SPE, por lo que se elige con fines comparativos. También se optimizó el proceso de extracción siendo estas condiciones iguales a las utilizadas para los polímeros en bloque.

7.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

7.3.1. Optimización de las etapas del proceso MISPE

La optimización del proceso MISPE conllevó la elección del disolvente o disolventes más adecuados, la concentración de la muestra y el empleo de los volúmenes óptimos en cada uno de los pasos. Para llevar a cabo los procedimientos MISPE se utilizó un sistema a vacío. En cada etapa del proceso, las fracciones recogidas fueron reacondicionadas e inyectadas en el HPLC-FD para determinar la concentración del analito.

7.3.2.1. Proceso MISPE. Polímeros sintetizados por precipitación

Optimización del procedimiento

Antes de iniciar la optimización, lo primero que se realizó fue una limpieza exhaustiva del polímero para volver a comprobar que no había plantilla inicial que interfiriese en los análisis posteriores. El MIP dentro del cartucho se lavó con una mezcla de MeOH y una mezcla MeOH:ácido fórmico (99:1, v/v).

La cantidad de 1OHPyr retenida fue calculada como la diferencia entre la cantidad inicial total cargada en el cartucho y la fracción recolectada en la etapa de elución. En cada proceso, los extractos obtenidos fueron inyectados en el sistema HPLC-FD para cuantificar el analito.

La Figura 7.2 muestra una fotografía tomada en el laboratorio con ambos cartuchos SPE empaquetados con el MIP_{precip} y el NIP_{precip}. Con estos polímeros y de forma paralela se optimizaron todas aquellas etapas del procedimiento MISPE, lo que incluyó los procesos de carga, lavado y elución, de forma que se obtuviese la máxima recuperación del 1OHPyr en el MIP minimizando la recuperación en el NIP. Quedaría de esta forma evaluadas las interacciones específicamente formadas entre el analito y los MIP sintetizados [385].



Figura 7.2. Fotografía tomada de los polímeros sintetizados por precipitación. A NIP_{precip} y B NIP_{precip}

Antes de cargar la muestra, el cartucho fue acondicionado con 800 μL de ACN para permitir la unión entre el analito y los sitios específicos formados en el polímero. De acuerdo con la literatura, el disolvente empleado para el acondicionamiento del polímero suele ser el porógeno empleado en la síntesis del mismo [198], buscando aquellos disolventes que favorezca la interacción entre los analitos y las cavidades específicas generadas en el polímero. Inicialmente, por tanto, se elige el porógeno debido a que las interacciones entre el analito y los sitios de unión estarán presumiblemente más favorecidas. Una vez acondicionado, se prepararon diferentes concentraciones del analito 1OHPyr en ACN en el rango 0,15-2,00 $\mu\text{g/L}$ para optimizar la concentración adecuada de carga. En este rango de concentración, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en la recuperación del analito. Este primer ensayo se realizó con un volumen de muestra de 200 μL . De acuerdo con estos resultados, y teniendo en cuenta los datos obtenidos en estudios recientes de biovigilancia [90], se escogió la concentración de 0,25 $\mu\text{g/L}$ como concentración de trabajo.

Una vez cargada la muestra, ésta se mantiene durante 5 minutos para permitir que toda la muestra percole y pueda estar en contacto con el MIP para posteriormente atravesar la columna con ayuda de un sistema a vacío. Posteriormente, se evaluaron diferentes volúmenes de muestra, entre 50-500 μL . Cuando el volumen de carga es de 200 μL el porcentaje de analito retenido en el cartucho se maximiza por lo que se escoge este volumen para seguir con el proceso.

La etapa de limpieza se realiza para eliminar los compuestos interferentes retenidos no específicamente en el MIP. La presencia de sitios de unión no específicos es atribuida a la gran cantidad de monómero empleado en la síntesis no covalente de los polímeros. En este paso, diferentes disolventes de lavado y volúmenes de los mismos fueron investigados, tales como agua, ACN, MeOH y mezclas de ellos. La gráfica muestra las recuperaciones del 1OHPyr obtenidas cuando 200 μL de una disolución de 0,25 $\mu\text{g/L}$ en ACN tanto en el MIP como el NIP, se someten a las etapas de carga, lavado y elución empleando diferentes disolventes de elución. En el eje y se representa el porcentaje del analito recogido tras cada etapa. Son mostradas en la Figura 7.3.

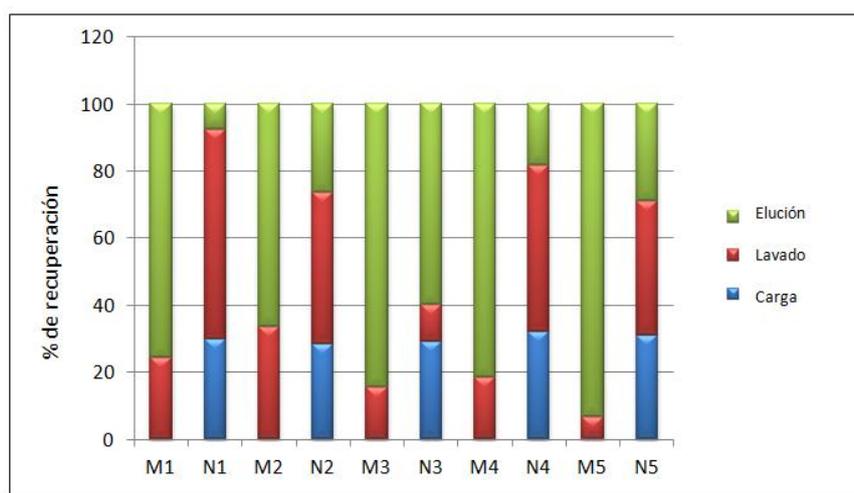


Figura 7.3. Optimización del disolvente de lavado. El cartucho que contiene el polímero impreso es denominado con la letra M, mientras que el polímero no impreso es denominado como N. Los números a continuación identifican los disolventes de lavado empleados, siendo estos: 1, ACN:MeOH (50:20, v/v); 2, ACN:MeOH (80:20, v/v); 3, H₂O; 4, ACN; 5, ACN:H₂O (95:5, v/v)

Las diferentes recuperaciones obtenidas para el NIP y MIP indican que las interacciones entre la plantilla y el polímero son específicas. El análisis de las fracciones recolectadas de la etapa de limpieza muestran que el 1OHPyr presenta mayor retención cuando el polímero es lavado con una mezcla de disolvente ACN:H₂O en una relación de volúmenes de 95:5, v/v. Modificando estas proporciones ACN:H₂O (50:50 ó 80:20, v/v), no se mejoró el resultado.

La optimización del volumen de lavado se realiza de manera análoga a la llevada a cabo en la etapa de carga, probándose volúmenes desde los 100 hasta los 400 μ L. El volumen óptimo de lavado se fijó en 100 μ L. Ni un aumento en el volumen de disolvente ni la repetición del lavado, aumentaba la cantidad de analito no retenido en la fracción obtenida, quedando retenido en el cartucho tras esta etapa el 93,43 % del analito.

Para asegurar la completa elución de los analitos adsorbidos en el proceso MISPE, es necesario encontrar el disolvente adecuado, el cual debe ser capaz de destruir la interacción formada entre el analito y el MIP. Consecuentemente, se evalúa la eficacia de varios disolventes polares para eluir el 1OHPyr del polímero. Los disolventes ensayados fueron MeOH:DCM, MeOH:ACN, y ACN:H₂O en diferentes proporciones. Además, habrá que considerar que el disolvente elegido debe ser compatible con la técnica de detección posterior.

La Figura 7.4 muestra la eficacia de la elución en términos de recuperación de estos disolventes y sus mezclas. La mayor recuperación (82,10%) se obtiene empleando una mezcla de disolvente polar prótico como el MeOH y un disolvente polar aprótico como el DCM en proporción de volumen de 85:15, v/v. Estos resultados sugieren que el 1OHPyr se ha unido a los sitios de enlace mediante puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, los cuales se ven afectados y alterados por la polaridad del disolvente que permite la rápida desorción del analito.

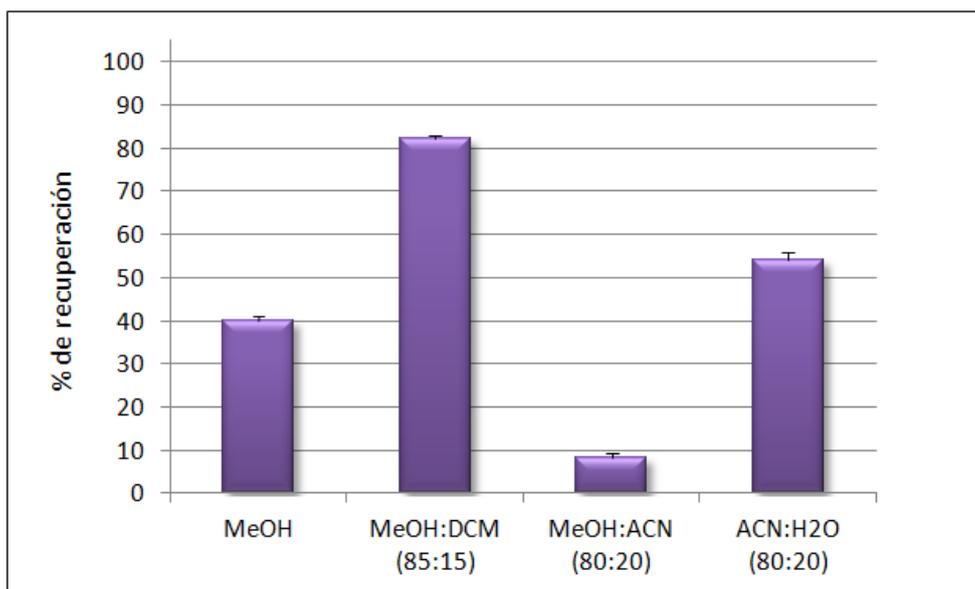


Figura 7.4. Optimización del disolvente de elución

Posteriormente, se probaron diferentes volúmenes de elución. Estos estudios revelaban que el volumen óptimo de elución era de 400 μL , obteniéndose mejores recuperaciones si esta operación se realizaba en 4 etapas de 100 μL (100 μL x 4).

Finalmente, el polímero se limpia con una mezcla de MeOH y MeOH:ácido fórmico al 1%, volviéndose a acondicionar para permitir su reutilización y poder comenzar un nuevo análisis.

Además de los disolventes señalados en el apartado anterior, también se probaron otros disolventes en el proceso de optimización sin obtener mejores resultados. Se enumeran a continuación los disolventes ensayados: MeOH:ác formico, ACN:Cloroformo, DCM:n-hexano, MeOH:ACN, ACN:H₂O, MeOH:DCM, MeOH:H₂O, MeOH:acetato de etilo, ACN:acetato de etilo, ACN:ácido fórmico, DCM, MeOH:ácido acético.

El mismo procedimiento fue efectuado con el NIP_{precip} para estudiar su comportamiento. Cuando las condiciones anteriormente descritas fueron verificadas en el polímero no impreso, no se detectó presencia del analito en el eluato obtenido, perdiéndose

entre las etapas de carga y limpieza el 83,52 % del analito presente, datos que reflejan que el analito no queda retenido. Comparado con el MIP, con el que se recuperaba un total del 82,10%, se puede concluir, que se ha sintetizado un MIP selectivo para el 1OHPyr.

Validación del procedimiento en muestras de orina

Una vez optimizado el método con muestras sintéticas se procedió a realizar todos los ensayos con la muestra real de orina, tomada de niños recién nacidos, y por tanto poco expuestos a la contaminación por HAPs. La muestra de orina fue dopada a distintas concentraciones de la disolución estándar de 1OHPyr. Las concentraciones fueron 0,15 µg/L, 0,25 µg/L y 2,00 µg/L.

De la misma manera que se describía anteriormente, el MIP se acondicionó con 800 µL de ACN. La etapa de carga se realizó con 200 µL de 1OHPyr en las diferentes concentraciones elegidas. La etapa de limpieza se efectuó con 100 µL de una mezcla de disolvente de lavado ACN:H₂O a una composición de (95:5, v/v). El disolvente de elución estaba formado por la mezcla de disolventes MeOH:DCM (85:15, v/v). El volumen utilizado fue de 100 µL, realizando en este caso en una sola elución. En estas condiciones se obtenía una recuperación del 78-90% con una RSD < 6,7%. No se detectó 1OHPyr en el eluato recogido procedente del NIP por lo que se confirmó la selectividad del polímero hacia el analito.

La Figura 7.5 muestra dos cromatogramas, en el primero de ellos (cromatograma A) la orina se inyectó directamente con 0,25 µg/L de 1OHPyr. El cromatograma posterior (cromatograma B) representa la misma muestra tras someterse al proceso MISPE descrito con anterioridad. En este caso se observó una disminución considerable del frente cromatográfico debido a impurezas de la muestra, que sí se observan en el cromatograma A, revelando la efectividad del cartucho para limpiar la muestra.

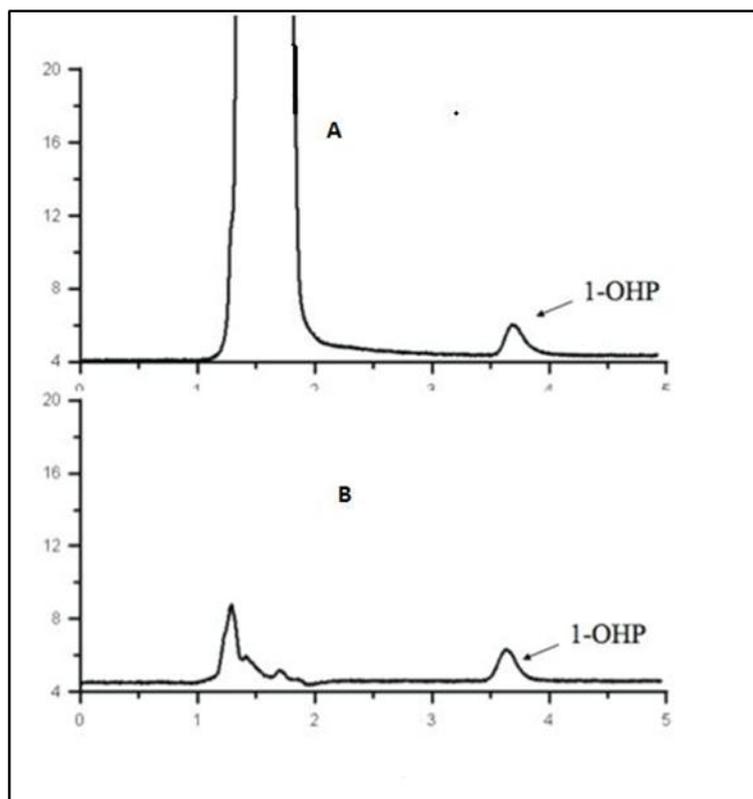


Figura 7.5. Cromatogramas de una muestra de orina (A) antes y después del proceso MISPE (B)

Para validar el método analítico desarrollado, se realizaron ensayos de precisión (reproducibilidad y repetibilidad) para los diferentes polímeros. Estos fueron los datos obtenidos en los distintos ensayos:

La repetibilidad del método (precisión inter-días), consistió en realizar 5 ensayos idénticos durante 5 días consecutivos. Para ello se doparon las muestra de orina con 0,15; 0,25 y 2,0 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr, realizándose el proceso MISPE en cada uno de los casos.

La reproducibilidad o precisión intra-días se constató en 5 muestras distintas dopadas con concentraciones de 0,15, 0,25 y 2,0 $\mu\text{g/L}$, pero los ensayos se desarrollaron en el mismo día.

Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 7.3

Tabla 7.3. Reproducibilidad y repetibilidad utilizando MIP_{precip}

	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Precisión (%)	Recuperación (%) \pm SD
Reproducibilidad	0,15	6,7	78 \pm 5
	0,25	1,0	85.7 \pm 0.9
	2	1,6	85 \pm 1
Repetibilidad	0,15	6,6	78 \pm 5
	0,25	2,5	87 \pm 2
	2	2,7	90 \pm 3

Los datos reflejan que para el MIP_{precip} se obtuvo una recuperación del 78-90% con una $RSD < 6,7\%$. Cuando las condiciones anteriormente descritas fueron verificadas en el polímero no impreso, los resultados fueron los recogidos en la Tabla 7.4, reflejando que el MIP es selectivo al analito.

Tabla 7.4. Resultados con el NIP

% Recuperación	NIP_{precip}
Carga- Lavado	92.96
Elución	0

7.3.2.2. Proceso MISPE. Polímeros sintetizados en bloque

Optimización del procedimiento

De manera análoga, se van a optimizar las diferentes etapas del proceso MISPE para el polímero sintetizado en bloque. De esta forma se podrá comparar el comportamiento de ambos polímeros.

El acondicionamiento, al igual que con el polímero sintetizado por precipitación, se aseguró con 800 μL de ACN. Posteriormente se va a optimizar tanto el volumen como la concentración de carga con el analito 1OHPyr. En este caso el empaquetamiento no es tan compacto como en el caso anterior y los disolventes atraviesan el polímero con mayor facilidad aunque igualmente, con ayuda del sistema de vacío. Como pasaba en el caso anterior, la carga de la muestra a distintas concentraciones queda completamente retenida en el polímero eligiéndose 0,25 $\mu\text{g/L}$ como concentración de trabajo.

Una vez cargada la muestra ésta se mantuvo durante 5 minutos permitiendo a la muestra percolar, transcurridos los cuales el sistema de vacío se conectó. La fracción eluida se recogió y se reconstituyó para ser analizada con el HPLC-FD. Se evaluaron diferentes volúmenes de carga del analito comprendidos entre los 50-500 μL , con la concentración de trabajo anterior, 0,25 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr, tras lo cual se llegó a la conclusión que el volumen óptimo de carga era en este caso de 150 μL .

Siguiendo el procedimiento anterior, se optimizó la etapa de lavado para limpiar el MIP de las sustancias no retenidas específicamente. En este punto, se probaron los mismos disolventes que en el caso anterior. La Figura 7.6 muestra de manera análoga los resultados obtenidos cuando se carga el MIP con 150 μL de 0,25 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr y se somete a la etapa de limpieza.

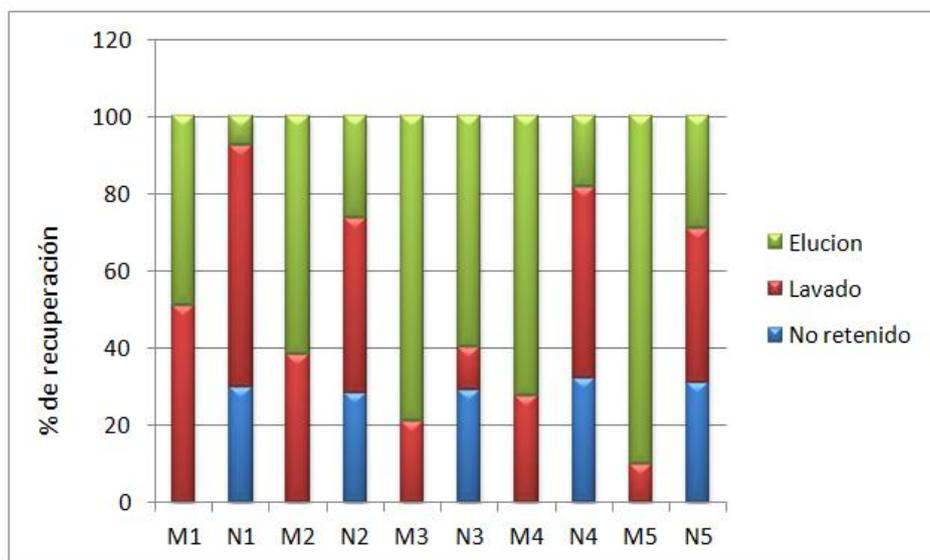


Figura 7.6. Optimización del disolvente de lavado. M polímero impreso, N polímero no impreso. Los números identifican los disolventes de lavado, 1 ACN:MeOH (50:20, v/v), 2 ACN:MeOH (80:20, v/v), 3 agua, 4 ACN y 5 ACN:H₂O (95:5, v/v).

Como en el caso del MIP_{precip}, la mezcla de disolventes formada por ACN:H₂O (95:5, v/v) que en el caso anterior fue la elegida para seguir con la optimización del proceso, dió los mejores resultados.

Una vez seleccionado el disolvente adecuado para el lavado de la muestra, el siguiente paso fue la optimización del volumen de dicho disolvente, de forma que permita las mejores recuperaciones del analito, minimizando sus pérdidas en esta etapa.

Volúmenes crecientes en un intervalo de 100 a 400 μ L de la disolución ACN:H₂O (95:5, v/v) son adicionadas al cartucho MISPE previamente cargado con 150 μ L de una disolución 0,25 μ g/L de 1OHPyr. Los extractos obtenidos son analizados con el HPLC-FD, reportando que el volumen óptimo de limpieza era de 100 μ L de la mezcla de disolventes ACN:H₂O (95:5, v/v). Ni un aumento en el volumen de disolvente ni la repetición del proceso, disminuía la cantidad de analito retenida en el cartucho que en este caso fue de 90,18% tras dicha etapa.

En la optimización de la etapa de elución se analizó el comportamiento de distintos disolventes y mezclas de los mismos en distintas proporciones y volúmenes con el objetivo de alcanzar la máxima recuperación de analito en esta última etapa. Los disolventes utilizados fueron MeOH, MeOH:DCM, ACN:H₂O ya probados con el MIP_{precip}. El volumen empleado en este ensayo fue de 200 μ L. Los resultados son presentados en la Figura 7.7.

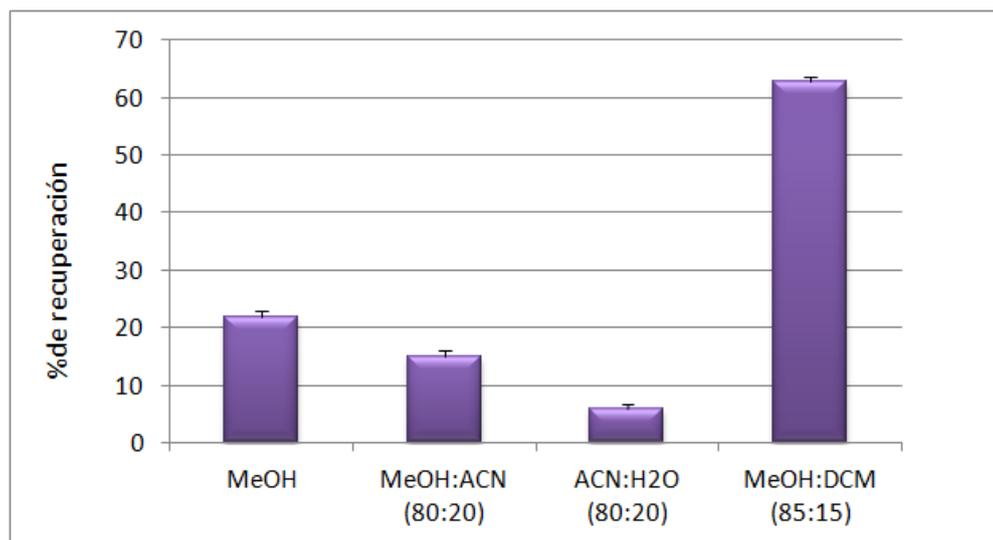


Figura 7.7. Optimización del disolvente de elución

De igual forma que sucedía en el MIP_{precip}, la mayor recuperación del analito se dio con la mezcla de disolventes MeOH:DCM (85:15, v/v).

Para finalizar, se optimizó el volumen del eluyente que se añade al cartucho MISPE en la última etapa del proceso, con la finalidad de obtener mejores recuperaciones y por tanto, mejores resultados.

Esta optimización es llevada a cabo con volúmenes crecientes del disolvente MeOH:DCM (85:15, v/v). Las mayores recuperaciones fueron obtenidas con un volumen de 150 μ L x 3. Era en estas condiciones cuando se obtenía una recuperación del 78,52%, un valor un poco inferior al obtenido cuando el proceso se realizaba con el MIP_{precip} con el que se obtenía una recuperación del 82,10%.

Posteriormente, el polímero se vuelve a lavar y a acondicionar para permitir su reutilización.

El mismo procedimiento fue efectuado con el MIP_{bloque} . Cuando las condiciones anteriormente descritas fueron verificadas en el polímero no impreso se obtuvo que en las etapas previas a la elución, la pérdida de analito era del 90,91%, por lo que el MIP_{bloque} es selectivo para el analito 1OHPyr.

Validación del procedimiento en muestras de orina

De manera análoga al MIP_{precip} , se validó el método para el polímero en bloque en muestras reales de orina a tres concentraciones de analito. Los resultados obtenidos son los mostrados en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5. Reproducibilidad y repetibilidad del MIP_{bloque}

	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Precisión (%)	Recuperación (%) \pm SD
Reproducibilidad	0,15	8,4	71 \pm 6
	0,25	8,4	73 \pm 7
	2	8,8	80 \pm 8
Repetibilidad	0,15	8,8	75 \pm 6
	0,25	2,9	75 \pm 2
	2	7,5	83 \pm 6

La Tabla 7.5 muestra como para el MIP_{bloque} se obtuvo una recuperación del 71-83% con una RSD < 8,8%.

Cuando las condiciones anteriormente descritas fueron verificadas en el polímero no impreso los resultados fueron los recogidos en la Tabla 7.6.

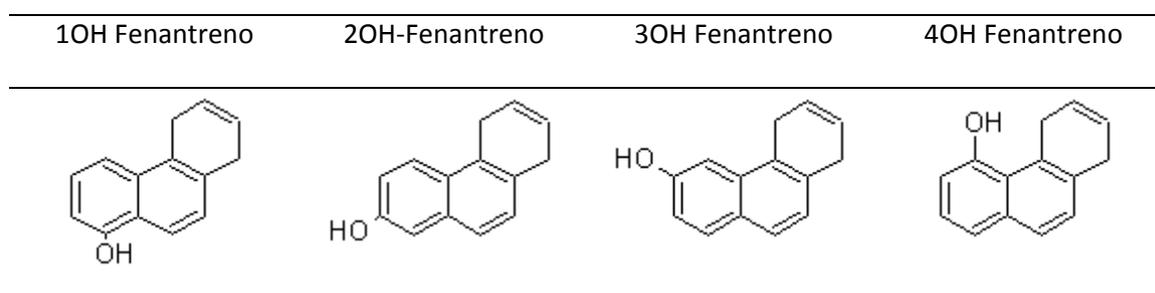
Tabla 7.6. Resultados con el polímeros no impreso

% Recuperación	NIP _{bloque}
Carga- Lavado	92,380
Elución	0

El polímero no es capaz de retener el analito, eliminándose más del 92 % del presente en la muestra. Puede concluirse, por tanto, que el MIP_{bloque} es selectivo para el analito 1OHPyr.

7.3.2. Estudios de selectividad

La completa confirmación de la capacidad de impresión incluye el estudio de la selectividad del polímero. Esta fue llevada a cabo analizando la capacidad de unión del MIP en presencia de otras sustancias con estructuras análogas a las del 1OHPyr como fueron los isómeros hidroxilados del fenantreno mostrados en la Figura 7.8.

**Figura 7.8.** Isómeros del derivado hidroxilado del fenantreno

La elección de los derivados hidroxilados del Phe tuvo en cuenta la similitud estructural con el 1OHPyr y su menor tamaño, además de estar presentes junto con el analito en la mayoría de las muestras. Los metabolitos del Phe han recibido un gran interés en la biovigilancia de los HAPs. Aunque sus concentraciones en orina son menos sensibles para evaluar la exposición de HAPs en fumadores que el 1OHPyr, son mejores candidatos cuando el estudio de biovigilancia comprende fumadores y no fumadores, o la exposición a la inhalación es específica para Phe en determinados ambientes industriales. Por otro lado, las dietas ricas

en HAPs causan una elevada excreción de los metabolitos del Phe en orina. Consecuentemente han sido utilizados para la biomonitorización de los HAPs en la dieta [33, 119].

El fenantreno es un compuesto formado por tres anillos aromáticos que se metaboliza en el organismo a hidroxifenantreno en sus distintos isómeros, siendo excretados por el organismo a través de la orina. Al estar presente en este medio junto con el 1OHPyr, estos pueden determinarse conjuntamente aportando información adicional de exposición a HAPs [99, 355]. Los HAPs requieren activación metabólica para expresar su carcinogénesis y los metabolitos del fenantreno pueden servir para evaluar dicha activación, incrementándose, por tanto, en los últimos años los métodos que determinan simultáneamente el 1OHPyr con dichos compuestos [33, 338].

Para llevar a cabo este estudio de interferencias, se trató de optimizar el método cromatográfico para realizar la separación de los isómeros del fenantreno, intentando solventar con ello, los problemas de coelución que son reportados en la bibliografía consultada [125, 386-389].

Aplicando el método cromatográfico utilizado para el 1OHPyr, los tiempos de retención para cada uno de los isómeros aparecían muy próximos entre sí, situándose la elución de los cuatro entre los 2,2, y 2,5 minutos, lo que impedía la cuantificación conjunta. Se intentó desarrollar un método cromatográfico que permitiese la separación de los picos, modificando los parámetros anteriormente optimizados para el 1OHPyr.

Manteniendo la misma columna y las mismas longitudes de excitación y emisión, se modificó la velocidad de flujo, (0,6; 0,8; 1,2 y 1,4 mL/min), sin conseguir la cuantificación individual de los compuestos.

Se probaron distintas proporciones de fase móvil, manteniendo el régimen isocrático, observando que un porcentaje de agua muy elevado permitía retardar los tiempos de

retención de los compuestos, partiendo de una composición MeOH: H₂O de 50:50, v/v, para ir aumentando la proporción de agua hasta el 100% sin conseguir solventar los problemas de coelución. La variación en la composición de dicha fase móvil, como ACN:H₂O, MeOH:ACN o ACN:MeOH tampoco mejoró el resultado, sin dar una solución satisfactoria.

Finalmente, se propuso realizar un gradiente de concentraciones a un flujo de 1 mL/min representado en la Tabla 7.7

Tabla 7.7. Gradiente de concentraciones en la separación de los isómeros del Phe

t (min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)
0	50	50
15	40	60
20	35	65

Con estas condiciones se obtuvo el cromatograma de la Figura 7.9. Los picos cromatográficos se corresponden de menor a mayor tiempo de retención con 3-OHPhe, 4-OHPhe, 2-OHPhe, y 1-OHPhe.

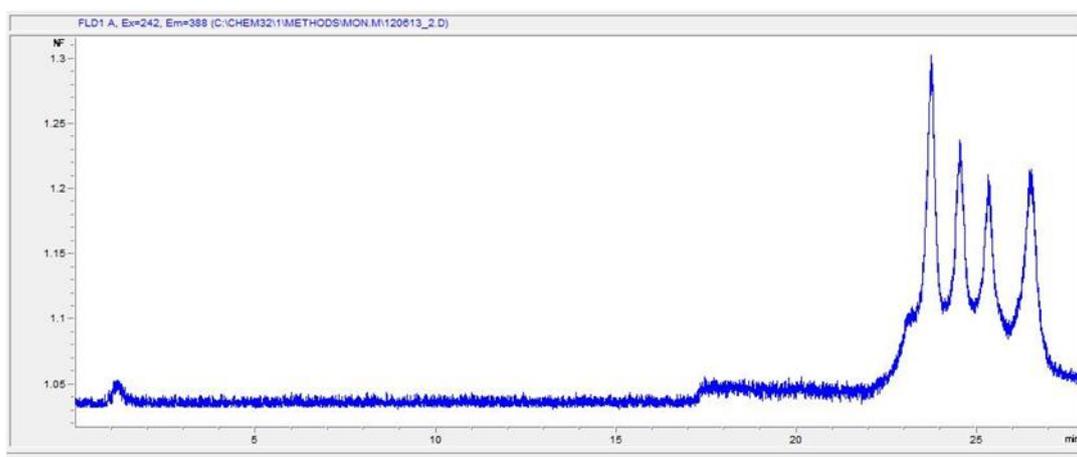


Figura 7.9. Cromatograma de los isómeros del Phe

A la vista de los resultados, y de acuerdo con la bibliografía, hasta el momento no se ha logrado la separación cromatográfica de los cuatro isómeros conjuntos del Phe, debido a la coelución de los mismos. Por ese motivo, el procedimiento MISPE optimizado se realizó de manera individual.

Por lo tanto, debido a que los derivados hidroxilados presentan problemas de coelución, el proceso MISPE se llevó a cabo individualmente con cada uno de los isómeros [118, 360, 388].

Los estudios de interferencias se realizaron exclusivamente para los polímeros de impresión molecular sintetizados por precipitación dado que este MIP ofreció los mejores resultados de unión con el analito que el MIP_{bloque}. Para ello, se prepararon disoluciones de 0,25 µg/L de cada analito partiendo de las disoluciones estándar. El procedimiento optimizado descrito anteriormente fue empleado para evaluar cada una de las mezclas. Los analitos fueron retenidos completamente en el cartucho de SPE. La Figura 7.10 muestra los resultados comparativos obtenidos en las etapas de lavado y elución.

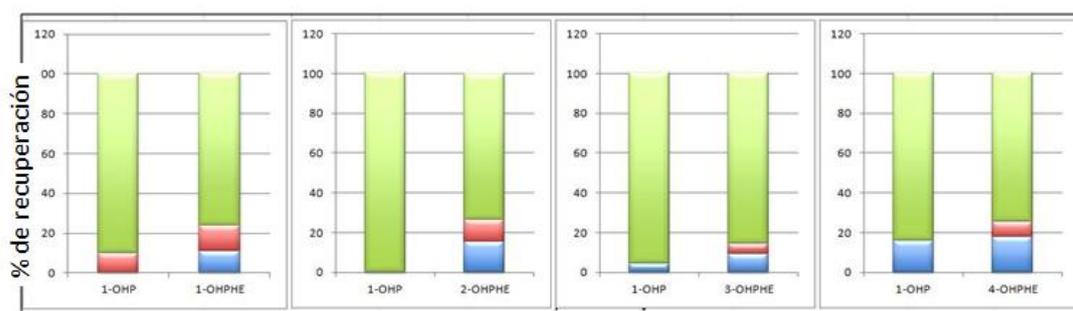


Figura 7.10. Selectividad de los isómeros del OHPhe con el 1OHPyr. La fracción no retenida se representa en color azul, la fracción de limpieza en color rojo y la eluida en color verde.

A la vista de la Figura 7.10, puede sostenerse, por tanto, que el MIP_{precip} muestra un alto grado de reconocimiento específico hacia el 1OHPyr, mucho mayor que el que presentaban los distintos metabolitos del Phe. Esto es debido al tamaño, forma y estereoquímica de las cavidades impresas. Sin embargo, la presencia del grupo hidroxilo en la

posición 1, exhibió un mayor grado de reconocimiento que los demás isómeros por los sitios de unión y una mayor competitividad con el 1OHPyr. Esto se deduce al advertir la presencia del 1OHPyr coeluyendo en la etapa de lavado junto con el 1OHPhe.

Consecuentemente, la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 1 (los demás isómeros) representa una mayor diferencia de unión con el 1OHPyr, ya que no se observó presencia de analito en la etapa de lavado. En estos casos, se deduce que existen mayores diferencias de unión entre los analitos y el MIP. Además, el menor tamaño de los isómeros del Phe respecto al 1OHPyr, denota que se implementan fácilmente dentro de los sitios de unión del polímero exhibiendo una buena unión con el MIP comparable con la unión del 1OHPyr. Sin embargo, a la vista de los resultados mostrados en la Figura 7.10, esto no afecta significativamente los valores de recuperación del 1OHPyr cuyo rango de recuperación estuvieron entre el 80-91%.

Por otro lado, los cuatro isómeros del fenantreno se dispusieron junto con el analito 1OHPyr, sometiéndose el procedimiento MISPE previamente descrito para el MIP_{precip}. Aunque la cuantificación individual no fue posible, sí que se observó que la presencia de los isómeros, no afectaba la recuperación del analito 1OHPyr, obteniéndose unas recuperaciones del orden de 82,8% en la etapa de elución.

En la Figura 7.11 se muestra un cromatograma donde puede observarse como la presencia de los isómeros no dificultaba la determinación del 1OHPyr.

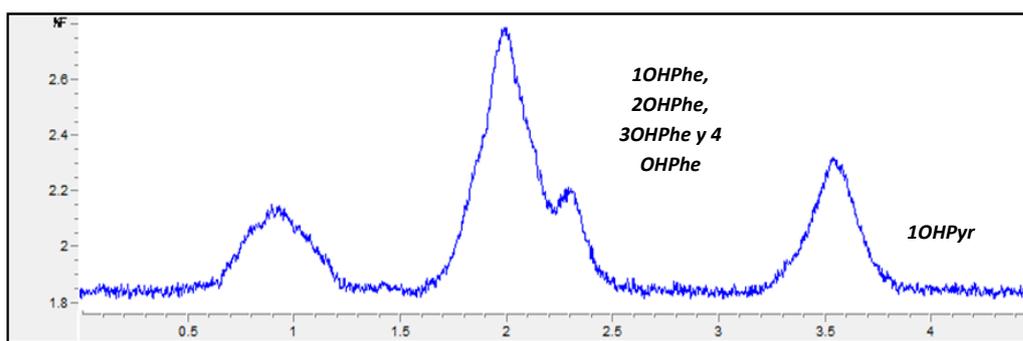


Figura 7.11. Cromatograma conjunto de los 5 analitos en muestras de orina tras procedimiento MISPE

Por lo tanto, se puede concluir, que la presencia de los isómeros de los compuestos hidroxilados del Phe no interfiere en la detección del 1OHPyr en el proceso MISPE, podemos decir, por tanto, que el MIP es específico para el 1OHPyr, pudiendo retener en menor medida a los demás.

7.3.3. Comparación de resultados con C-18

Una vez optimizadas las diferentes etapas del MISPE, se probaron las condiciones SPE en un cartucho comercial de la marca Symta de 1 mL de capacidad y relleno con partículas C-18 en vez de con los polímeros impresos. Para llevar a cabo la comparación de los resultados se tuvo en cuenta su mayor semejanza con el polímero sintetizado en bloque y se aplicaron de manera análoga esas condiciones.

Se tomaron 150 μ L de una muestra de 0,25 μ g/L de 1OHPyr en orina libre de HAPs. La carga se mantuvo durante 5 minutos para facilitar que el analito se mantuviese en contacto con el material adsorbente. En la fracción recogida tras la etapa de carga se observó la presencia del analito en un 16%, es decir, no se retuvo el 84% del analito cargado.

La etapa de limpieza se realizó con 100 μ L de la mezcla de disolventes ACN:H₂O (95:5, v/v), en este caso el analito no retenido supuso el 35,5% del total.

El eluato obtenido tras la etapa elución realizada con 100 μ L de MeOH:DCM (85:15, v/v) dio una recuperación del 23,2 % del analito total, confirmando la mejora introducida en el tratamiento de muestra utilizando el MIP. El empleo de los polímeros de impresión molecular para realizar un MISPE añade una gran selectividad hacia el analito de interés.

7.4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir:

- En este estudio se han empleado distintos MIP como material adsorbente en un proceso MISPE para la determinación de metabolitos hidroxilados de los HAPs. Una vez los parámetros del MISPE fueron optimizados, el procedimiento fue validado empleando muestras de orina humana.
- Se ha desarrollado una nueva metodología eficaz de tratamiento de muestra y extracción selectiva mediante el procedimiento de extracción en fase sólida, empleando polímeros de impresión molecular para la determinación del 1OHPyr (MISPE-HPLC-FD). Los polímeros impresos como material adsorbente selectivos para el 1OHPyr, han demostrado una alta selectividad hacia el analito de interés, evidenciando la creación de cavidades específicas para el reconocimiento del 1OHPyr.
- Los MIP han permanecido estables durante todos los ensayos aun siendo sometidos a procesos agresivos de limpieza.
- Se ha comparado el comportamiento de dos polímeros sintetizados de distinta manera, comparando sus resultados tras el proceso MISPE. Los métodos fueron validados ofreciendo unas altas recuperaciones, bajos límites de detección, buenos resultados de repetitividad y reproducibilidad, además de suministrar una gran especificidad en la determinación del 1OHPyr. Finalmente se ha comparado la recuperación de analito en estos polímeros y en un cartucho comercial C-18.

- El método admite una mínima manipulación de las muestras, siendo rápido y sencillo, permitiendo el análisis rutinario del compuesto 1OHPyr. Aunque la separación cromatográfica de los metabolitos del fenantreno no se pudo llevar a cabo, el MIP mostró un alto grado de reconocimiento específico hacia el 1OHPyr, sin que la presencia de otros compuestos llega a interferir en la detección del analito.
- El método de polimerización por precipitación dio mejores resultados debido a la geometría y homogeneidad de los sitios de unión con el analito respecto al sintetizado en bloque, además de que con el MIP_{precip} se evitó la manipulación del polímero sin necesidad de tener que tamizar ni triturar, evitando pérdidas y tiempo de preparación del material adsorbente. Este polímero mejoró sensiblemente las propiedades del MIP sintetizado en bloque.
- Los resultados mostrados ponen de manifiesto que el material MIP_{precip} como material adsorbente es muy adecuado para la extracción y limpieza del 1OHPyr en muestras de orina. La reducción del tamaño de los cartuchos de extracción lleva asociado además diversas ventajas, simplificando el proceso global, como son un menor coste y menor generación de residuos al emplearse pequeñas cantidades de disolvente.
- Las recuperaciones obtenidas con este procedimiento mejoran los resultados obtenidos en la literatura respecto a otros absorbentes, usualmente C-18 [102, 108, 120, 338, 345, 354]. Estos resultados muestran que el MIP es un absorbente mucho más efectivo que puede ser satisfactoriamente aplicado para extracción del 1OHPyr. Por otra parte, se han demostrado las ventajas del MIP como absorbente dando una mayor especificidad frente a los adsorbentes tradicionales.
- En la bibliografía sólo se han encontrado dos trabajos que empleasen los MIP para la determinación de HAPs [235, 301], siendo este trabajo el primero que emplea un polímero impreso para determinar metabolitos en la orina. Los resultados tanto de

reproducibilidad como de sensibilidad y recuperación obtenidos indican que el método descrito puede ser empleado en estudios de biovigilancia.

8. PROCEDIMIENTO FIA PARA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE 1-HIDROXIPIRENO CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

8.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo, se presenta un sistema FIA-MISPE que emplea un polímero de impresión molecular empaquetado en una microcolumna para la preconcentración y aislamiento del 1OHPyr en orina con detección de fluorescencia. La preconcentración del analito estará basada en la retención específica existente entre el MIP y el 1OHPyr. Hasta el momento y revisada la bibliografía, no se ha encontrado ningún artículo donde esta metodología haya sido aplicada al analito de interés, suponiendo éste un método rápido y novedoso para la preconcentración y determinación del 1OHPyr en estas muestras de orina.

Como se ha puesto de manifiesto en capítulos anteriores, en los últimos años, se han publicado numerosos métodos analíticos para la determinación del 1OHPyr y otros metabolitos de los HAPs. Sin embargo, además de los avances realizados en el desarrollo de nueva instrumentación, los cambios más importantes se han producido en los recientes enfoques con los que se ha afrontado el tratamiento de muestra en el análisis de trazas en matrices complejas. Las nuevas estrategias tienden a buscar procedimientos más selectivos de extracción y a potenciar la automatización y el acoplamiento a las técnicas cromatográficas [133, 239]. Todo ello, intentando que la extracción de los analitos se realice en el menor tiempo posible, evitando la manipulación de la muestra y minimizando las cantidades de disolventes a utilizar. En este contexto, las técnicas de análisis en flujo proveen mejoras que hacen posible conseguir los objetivos marcados por las nuevas tendencias en la Química Analítica [390, 391]. El desarrollo de métodos automatizados de análisis permite disminuir los errores resultantes de la intervención humana. Con ello, se consigue mayor reproducibilidad en la medida, menor cantidad de reactivos necesarios y tiempos de análisis más cortos,

además de poder abarcar un mayor número de determinaciones con un mayor beneficio tanto económico como medioambiental.

De un modo general, los sistemas en flujo se pueden clasificar, según el proceso de muestreo, en continuos y discretos, y según las características del flujo, en segmentados, no segmentados o monosegmentados. La clasificación según la IUPAC [392] se resume en la Figura 8.1.

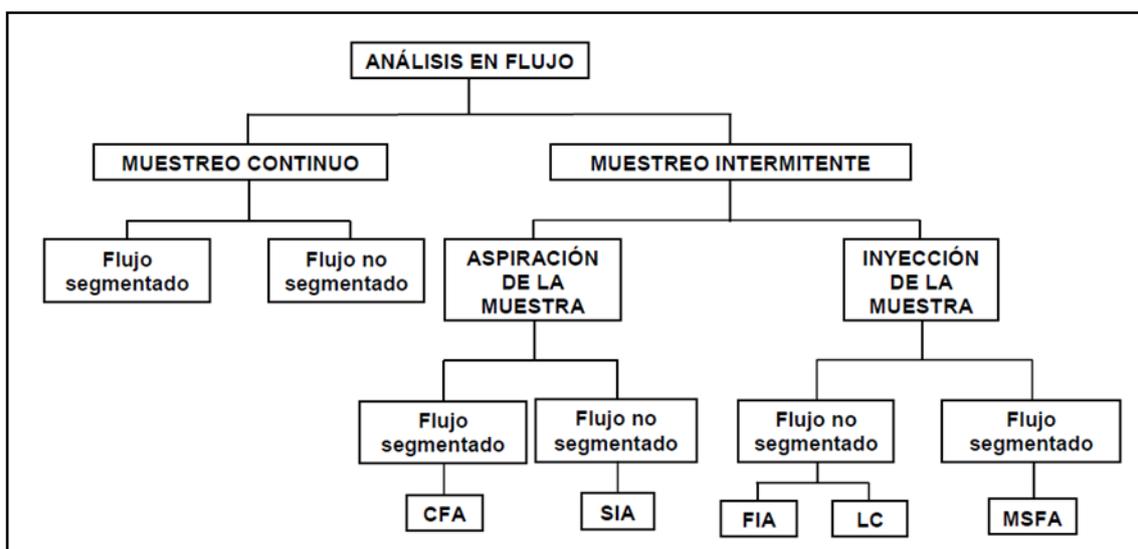


Figura 8.1. Clasificación de los sistemas en flujo (IUPAC). CFA: flujo continuo multisegmentado. FIA: análisis por inyección en flujo. LC: cromatografía líquida. MSFA: análisis en flujo monosegmentado. SIA: análisis por inyección secuencial

A continuación se describen brevemente los fundamentos de los distintos sistemas de flujo presentados en la Figura 8.1:

- Análisis en flujo multisegmentado (CFA): En estos sistemas las muestras se aspiran secuencialmente y son segmentadas por burbujas de aire. Esta segmentación permite favorecer el mezclado de las disoluciones tanto de reactivos como de muestras, aislándolas de la disolución portadora [393].

- Análisis por inyección en flujo (FIA): Las muestras se procesan individualmente. Se basa en la inserción de una alícuota en un flujo de una disolución portadora que la conduce hasta el detector.
- Análisis en flujo monosegmentado (MSFA): La muestra se introduce entre dos burbujas de aire, formando un monosegmento. Permite minimizar la dispersión, en relación con el sistema FIA. Se emplea cuando la cinética de la reacción es lenta [394].
- Análisis por inyección secuencial (SIA): Las disoluciones se introducen en el sistema analítico de forma secuencial. Esto se controla mediante un software especializado, con ayuda de una válvula multipuertos [395].
- Análisis por inyección multiconmutación: Utiliza como dispositivo fundamental válvulas solenoides de 3 vías. Ofrecen la posibilidad de determinar diferentes analitos en condiciones diversas manteniendo la estructura del módulo constante [396].

El trabajo presentado en este capítulo propone un sistema de análisis de inyección en flujo (FIA). Los métodos de inyección en flujo o FIA son métodos automáticos en flujo continuo no segmentado, que se basan en la introducción y el procesamiento de la muestra en una corriente continua de una fase líquida en la que ésta se introduce [397]. La corriente se mantiene con la ayuda de un módulo de impulsión del fluido. Esta corriente portadora confluye con la corriente de reactivo transportándose a través de un sistema de conducciones de pequeño diámetro hasta llegar al detector. Este tipo de sistema fue desarrollado originalmente en Dinamarca por Ruzicka y Hansen [398] y posteriormente, también otro sistema similar, fue utilizado en EEUU por Stewart en 1975 [399]. Debido a su versatilidad, precisión, rapidez y sencillez, los sistemas FIA han sufrido un gran desarrollo aplicándose a un gran número de metodologías analíticas.

Las características principales de un sistema FIA son:

- Flujo no segmentado por burbujas de aire.
- La muestra líquida es inyectada directamente al flujo.
- Se realiza un transporte de la muestra inyectada a través de un sistema de canales en los cuales puede llevarse a cabo un proceso físico-químico.
- La señal que proporciona el detector es transitoria.

Entre sus ventajas más destacadas se encuentran la rapidez, simplicidad de su configuración, su fácil manejo y flexibilidad, además de su bajo coste y robustez [390]. Entre sus desventajas destaca el recalibramiento del sistema debido al deterioro del material [400].

Los componentes básicos del sistema se pueden consultar en la Figura 8.2 y son descritos a continuación:

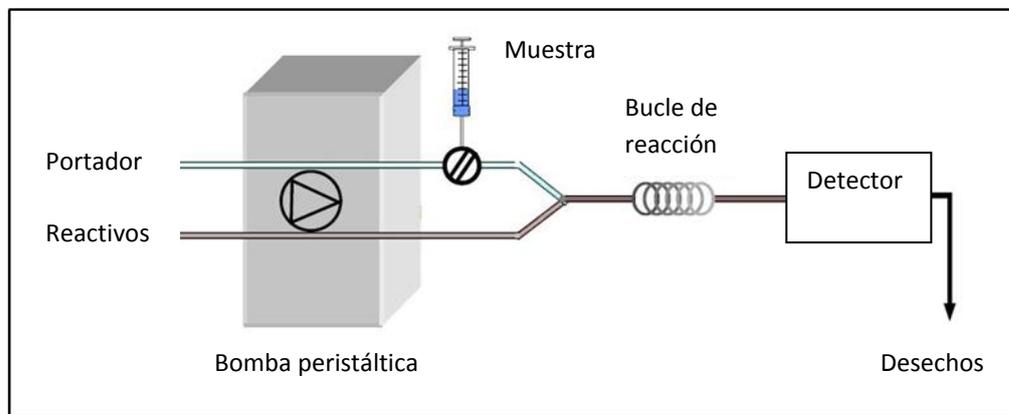


Figura 8.2. Sistema de análisis por inyección en flujo

Unidad de propulsión: que establece un flujo de caudal constante ausente de impulsos y perfectamente reproducible. Se suele emplear una bomba peristáltica que básicamente consiste en un tambor que contiene una serie de rodillos que comprimen un tubo flexible lo

que provoca un vacío que ayuda a transportar el líquido. El detalle del funcionamiento de la bomba peristáltica puede consultarse en la Figura 8.3 [401].

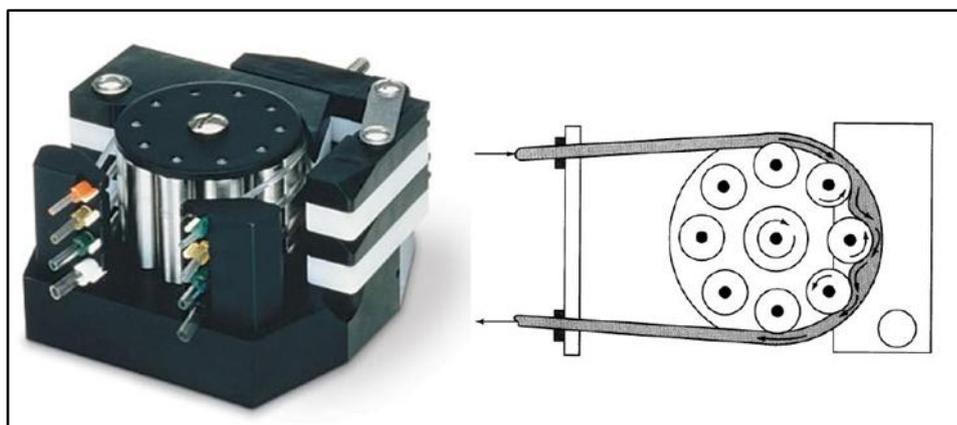


Figura 8.3. Unidad de propulsión. Cabezal de bomba peristáltica [401]

Sistema de inyección: cuya misión será introducir una cantidad definida de muestra en la corriente del portador. Se suelen emplear las válvulas rotatorias de seis vías. Han de ser sistemas muy reproducibles en cuanto a volúmenes de carga, a la vez que rápidos y de fácil manejo así, como tener una aceptable capacidad de automatización.

El funcionamiento de la válvula rotatoria de seis puertos para las dos posiciones, de carga y de inyección se describe a continuación en la Figura 8.4 [402].

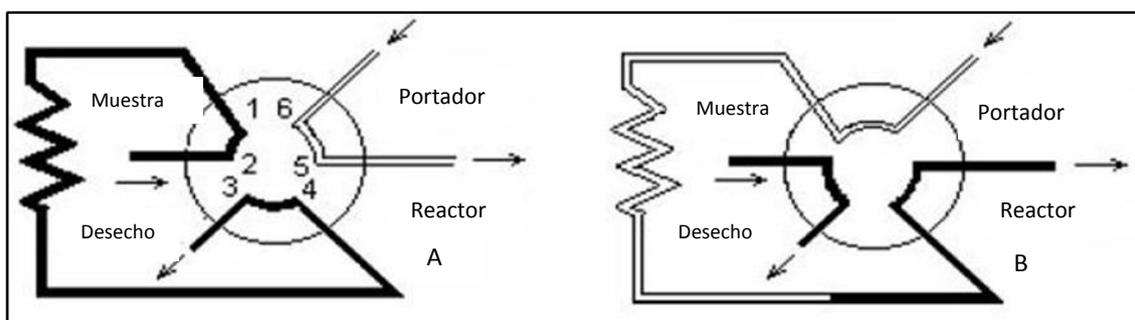


Figura 8.4. Válvula de 6 vías. La válvula en posición A representa la posición de carga, mientras que la válvula en la posición B representa la posición de inyección [402].

Sistemas de transporte: los cuales sirven para conectar los distintos elementos del sistema conduciendo los distintos fluidos. Generalmente son realizados a base de materiales como el teflón o polipropileno, resistentes tanto a los reactivos como a temperaturas agresivas. Los sistemas de transporte se dividen en tubos, conectores y reactores. En estos últimos es donde se dan los procesos físico-químicos, base del método analítico. Están diseñados en diferentes formas (rectos, espiral, helicoidal) con o sin relleno. En este último caso, la estrategia que ha despertado un gran interés en los últimos años es el empleo de reactivos inmovilizados en microcolumnas, de tal forma que el flujo de caudal atraviese dicho material. El empleo de reactores en fase sólida presenta una serie de ventajas analíticas respecto a los sistemas homogéneos en disolución. Entre ellas destaca el aumento en la sensibilidad analítica y en la velocidad de inyección, derivadas de una menor dispersión sufrida por la muestra. Esto es así porque la transferencia radial de masas en un lecho empaquetado es mucho más intensa. El incremento de la sensibilidad se debe también a que los reactivos están preconcentrados, lo que se traduce en un aumento de la señal analítica. La espiral de reacción, en este caso, sin reacción química, hace referencia a reactores donde la interacción con la muestra se limita a un proceso físico-químico de adsorción, extracción o enlace electrostático, sin alteración química de la especie retenida para tareas de preconcentración del analito y eliminación de interferentes [403].

Las condiciones del soporte de inmovilización que deben reunir para su uso en FIA serían:

- Tamaño de partícula adecuado que permita el flujo libremente para poder trabajar a presiones adecuadas.
- Estabilidad mecánica.
- Inercia química frente al portador y reactivos.

Sistema de detección: como cualquier sistema de detección, transforma la señal del analito en energía. La señal analítica que se obtiene en un sistema FIA se denomina fiagrama, y es una representación de dicha señal medida frente al tiempo.

Para que resulte adecuado en FIA, un detector tiene que reunir una serie de características, como puede ser su bajo nivel de ruido, dar una señal independiente del caudal, además su respuesta debe ser rápida (ya que miden en flujo), sensible y lineal en un amplio margen de concentración.

En respuesta a la necesidad de automatizar el pretratamiento de la muestra, se han planteado varios procedimientos FIA para el análisis de HAPs. En ellos se suele incluir una microcolumna de diversos rellenos (nanotubos de carbono, polímeros de coordinación, fase estacionaria C-18) o llevando a cabo una reacción luminiscente [404-409]. Sin embargo, existen muy pocos para la determinación de los metabolitos hidroxilados. Por ejemplo, por citar algunos, se han propuestos análisis fluorimétricos sobre soporte sólido para la determinación de 1OHPyr en orina empleando discos de C-18 [410] o se han estudiado otros sistemas de pretratamiento de muestra empleando, por ejemplo, precolumnas acopladas a sistemas HPLC para, mediante un sistema *on-line* que permita la inyección directa de las muestras de orina, determinar 1OHPyr [411].

Se han montado sistemas de columnas *on line* acopladas a HPLC multiconmutacionales para determinar en orina los isómeros monohidroxilados del B[a]Pyr [353] ó 1OHPyr [347]. En sistemas *off line* se han realizado SPE para la extracción y cuantificación del 3-hidroxibenzo [a]pireno [252, 301], incluso se ha optimizado un sistema Rapid Trace[®] en SPE para la medición de 23 metabolitos de HAPs en muestras de orina [312].

Siguiendo esta tendencia, se ha descrito un método de inyección en flujo basado en la extracción en fase sólida para la preconcentración y determinación del 1OHPyr en muestras de

orina, empleando un polímero de impresión molecular (MIP) como material adsorbente. Comparado con los materiales tradicionales, los MIP han demostrado ser más efectivo y han sido satisfactoriamente aplicados para la preconcentración y el aislamiento de analitos en muestras complejas en los últimos años [135, 137]. Por otro lado, las técnicas en flujo son técnicas rápidas, robustas y flexibles, que emplean menor cantidad de muestra, reduciendo por tanto los costes de reactivos y de desechos [390].

8.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

8.2.1. Detección fluorimétrica

Para la detección fluorimétrica se utilizó un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 controlado por el software FL WinLab. El espectrofluorímetro consiste en una fuente de luz de excitación que puede ser una lámpara de UV o láser y un juego de lentes para dirigir el haz de luz hasta el monocromador de excitación, que es el que selecciona la longitud de onda de luz que incidirá en la muestra. Una vez esta luz ha interactuado con la muestra, la radiación emitida llega al monocromador de emisión y posteriormente es capturada por un detector que la procesa y la envía a un ordenador, donde un software procesa la señal. De esta forma se obtienen los espectros de absorción y emisión de un material luminiscente.

El espectro de excitación se obtiene fijando la longitud de onda de emisión en el monocromador de emisión y se hace un barrido en un intervalo de longitudes de onda para encontrar el valor óptimo que servirá para excitar la muestra. Para obtener el espectro de emisión, se fija la longitud de onda en el monocromador de excitación y se hace un barrido en un intervalo de longitudes de onda para determinar los picos característicos de emisión del material.

La intensidad de fluorescencia fue medida a $\lambda_{ex}=242$ y $\lambda_{em}=388$ con una anchura de rendija de 2,5 nm tanto de excitación como de emisión ajustando la señal/ruido y mejorando

la resolución de la señal. El pico detectado es cuantificado en un diagrama que es la representación gráfica de la intensidad de la señal frente al tiempo.

8.2.2. Configuración del sistema FIA

La configuración del sistema FIA se dispuso como muestra la Figura 8.5.

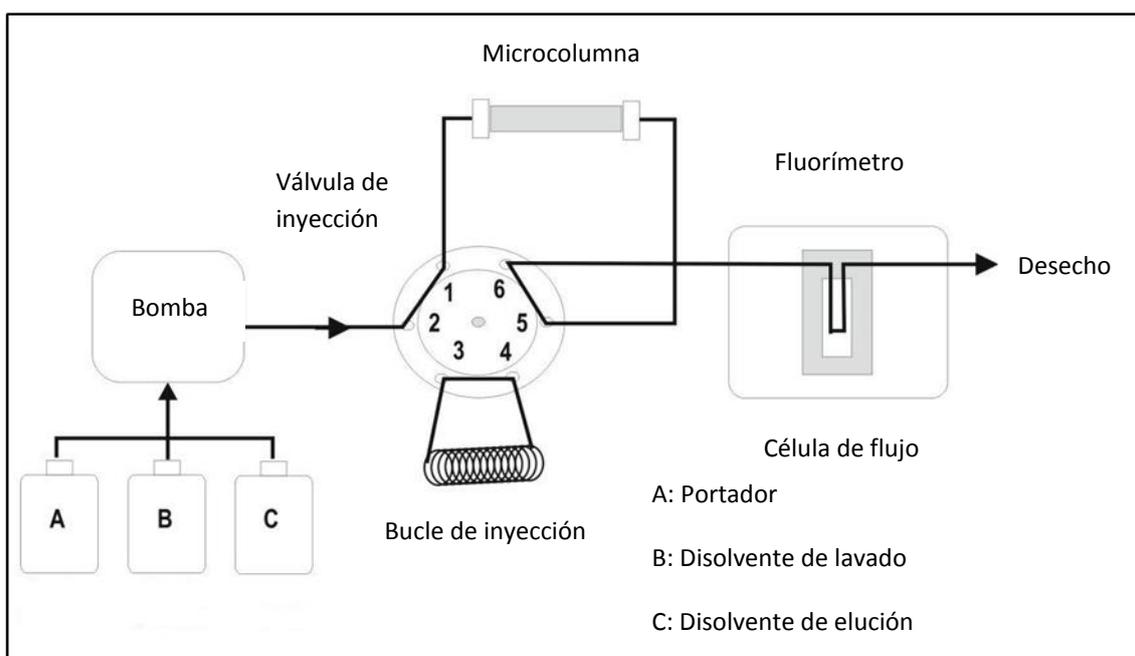


Figura 8.5. Esquema del montaje del sistema FIA para la determinación del 10HPyr. Las disoluciones empleadas fueron A= ACN, B: mezcla de ACN:H₂O en proporción (95:5,v:v) y C: mezcla de MeOH:DCM en proporción (85:15, v:v)

La microcolumna fue preparada con 11,3 mg de polímero MIP (la fracción de tamaño de partícula elegida correspondía a un intervalo de entre 50-100 μm), sintetizado en bloque y empaquetado con ayuda de una jeringa en un tubo de 1,8 cm de longitud y 0,8 de diámetro de politetrafluoroetileno (PTFE). En el sistema FIA, la corriente de flujo fue generada por una bomba peristáltica (minipuls 2 Gilson) a una velocidad de 1 mL/min y las muestras fueron introducidas a través de una válvula rotatoria de 6 canales (Omnifit, Cambridge) provista de un bucle de 250 μL de capacidad. Un tubo de 0,8 mm de diámetro interno conectó la válvula, la

microcolumna y la célula de flujo que estaba situada dentro del compartimento del espectrofluorímetro.

Se preparó de igual forma una microcolumna conteniendo el NIP_{bloque} para estudiar la selectividad del polímero para el 10HPyr.

La Figura 8.6 muestra una fotografía tomada en el laboratorio de la disposición del montaje y de la célula de flujo que se encontraba dentro del espectrofluorímetro.

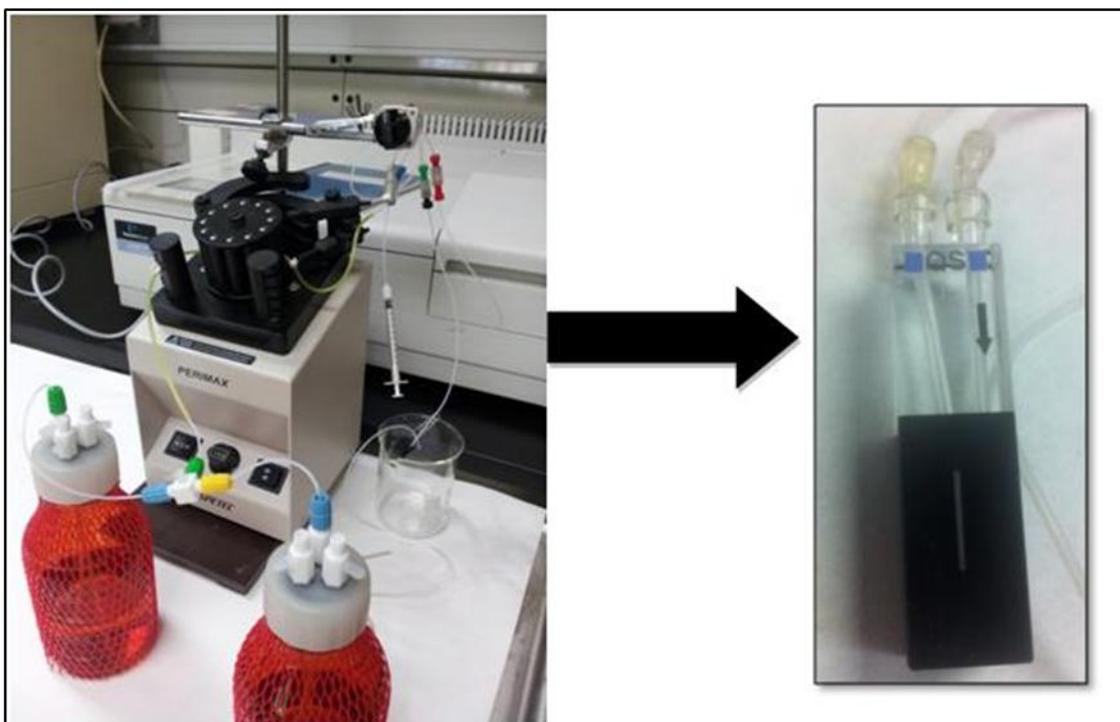


Figura 8.6. Esquema del montaje FIA. Célula de flujo (Quartz Suprasil[®]) de 150 µL empleada en el montaje FIA

8.2.3. Procedimiento FIA

Una vez preparado el montaje FIA, el procedimiento comenzó con un flujo del portador (ACN) a una velocidad de 1 mL/min que atravesaba la microcolumna empaquetada con el polímero MIP_{bloque} hasta conseguir una línea base estable. En ese momento 250 µL de muestra era inyectada en el sistema a través de la válvula de inyección. Los analitos quedaban

entonces retenidos en el polímero de la columna. Se llevó a cabo una etapa de limpieza con una solución portadora de una mezcla ACN:H₂O (95:5, v:v). La elución se realizó empleando como disolución eluyente una mezcla formada por MeOH:DCM (85:15, v/v), que al atravesar la columna arrastraba al analito del MIP. La intensidad relativa de fluorescencia es entonces medida de forma continua en el espectrofluorímetro. El pico detectado, debido al paso del analito a través de la célula de flujo, fue medido y cuantificado. Cuando la señal de fluorescencia retorna a la línea base, el sistema queda listo para la siguiente determinación.

8.2.4. Proceso FIA en muestras de orina

El método optimizado fue aplicado en la determinación de 1OHPyr en orina de niños recién nacidos dopadas a la concentración requerida. Para ello se tomó 1 mL de muestra de orina libre de HAPs, la cual se dopará con las concentraciones adecuadas de 1OHPyr. La orina fue previamente filtrada con un filtro Whatman PPW/GMF con un tamaño de poro de 0,45 μ m. La muestra se inyectó en el bucle de inyección de 250 μ L a un flujo de 1mL/min, procediéndose a llevar a cabo las etapas de lavado y elución anteriormente optimizadas.

8.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

8.3.1. Optimización del método fluorimétrico

Para la optimización de las variables del método fluorimétrico, se tuvieron en cuenta las longitudes de onda reportadas en el anterior capítulo 5, eligiéndose por tanto longitudes de onda de excitación y emisión de $\lambda_{ex}=242$ nm y $\lambda_{em}=388$ nm.

El siguiente parámetro a optimizar fue la anchura de la rendija del monocromador. La mejor resolución de la señal del pico se deba con una anchura tanto de excitación como de emisión de 2,5 nm. Se probaron distintas anchuras de la señal en rangos de 0 a 2,5 nm, tanto para la anchura de emisión como la de excitación, obteniéndose la mejor resolución con el valor de 2,5 nm para las dos anchuras del monocromador.

8.3.2. Optimización de las etapas del proceso FIA

Previamente al sistema FIA desarrollado y optimizado (Figura 8.4) se probaron otros diseños que incluían el polímero dentro de la célula de flujo [412, 413].

Para estos ensayos, se empaquetó el polímero integrado en la célula de flujo, se taponó con una red de nylon la salida del polímero para evitar que la corriente arrastrase las partículas del polímero hasta el detector.

El primer polímero empaquetado se correspondió con el MIP realizado por precipitación. Los primeros ensayos se llevaron a cabo inyectando una muestra de 100 µg/L de una disolución estándar de 1OHPyr en ACN. De esta forma se obtuvo una señal fluorimétrica que no volvía a ser reproducible, seguramente debido a que el flujo de portador hacía compactar el empaquetamiento del MIP impidiendo el paso óptico de luz en las posteriores medidas sin que la señal pudiese llegar al detector. El pequeño tamaño de las partículas formadas por precipitación, probablemente impedían el paso óptico de la luz. Teniendo esto en consideración, se probó con el polímero en bloque incluyendo en el empaquetamiento partículas de vidrio de poro controlado CPG (*glass controled pore*) junto con el MIP en la misma proporción (50:50). Se probaron diferentes proporciones en la relación MIP:CPG como fueron 80:20, 60:40, 40:60. De igual forma se probó pero con las partículas del MIP sintetizado en bloque mezclados con CPG en las mismas proporciones anteriores sin conseguir la reproducibilidad de las medidas por lo que se desestimó esta línea de investigación, centrando el trabajo en el empaquetamiento del MIP en una microcolumna externa al sistema detector.

Se llevó a cabo el ensayo de diferentes configuraciones del montaje FIA, así como la optimización de las distintas variables que pudiesen influir en dichos sistemas, tanto químicas como hidrodinámicas (velocidad de flujo, volumen de inyección...), siempre con el objetivo de buscar la sencillez del procedimiento

Primeramente se estudió el MIP_{bloque} y se optimizó el tamaño de partícula de la microcolumna. Para llevar esto a cabo se prepararon distintas microcolumnas rellenas con distinto tamaño de partícula, observándose que partículas de un tamaño inferiores a 50 μm producían sobrepresiones en el sistema, mientras que partículas cuyo tamaño era superior a 100 μm conducían a picos de fluorescencia demasiado anchos. La microcolumna se empaquetó entonces con el polímero MIP_{bloque} con un tamaño de partícula comprendido en ese intervalo. El polímero se mantuvo entre dos topos constituidos por una red de nylon para evitar el arrastre del mismo por el flujo del portador y de los diferentes disolventes.

Paralelamente, se preparó de la misma forma y con las mismas características otra microcolumna rellena con el NIP_{bloque}. De esta forma se podía estudiar la selectividad del polímero impreso frente al no impreso, solamente cambiando las columnas en el sistema. Se muestra a continuación, en la Figura 8.7, una fotografía tomada en el laboratorio mostrando el empaquetamiento de la columna conteniendo el MIP_{bloque}.



Figura 8.7. *Detalle de la microcolumna empaquetada con el MIP_{bloque}*

Otros parámetros que se tuvieron en cuenta a la hora de optimizar el procedimiento fueron:

- Volumen de inyección de muestra: Su optimización influirá sobre la dispersión. Se probaron bucles de distintos tamaños tales como 100, 250, 400 y 500 μL . Se observó que el uso de un volumen de 250 μL no provocaba un aumento en la dispersión de la señal. El bucle se realizó con un tubo de PTFE de 50 cm de longitud y 0,8 mm de diámetro interno.

- Caudal o velocidad de flujo: al aumentar éste, disminuía la dispersión y la anchura de pico. El estudio de la velocidad de flujo reveló que la señal aumentaba a flujos altos. Para la optimización del caudal se ensayaron varias velocidades de flujo comprendidas en el intervalo 0,1-1 mL/min, siendo éste último el que proporcionaba una mejor señal analítica.
- Longitud de los tubos: parámetro relacionado con la dispersión. Se ajustaron las longitudes de los sistemas de transporte para que la medida fuese rápida y se obtuviese una buena señal analítica. Se comprobó que según aumentaba la longitud de los tubos, aumentaba la dispersión de la señal.
- La reproducibilidad de las medidas se veía mejorada si previamente al montaje, las diferentes disoluciones eran desgasificadas en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos antes de incorporarse al caudal. De esta forma se evitaban la presencia de burbujas dentro del sistema que pudiesen modificar la señal una vez que ésta llega al detector.
- Disolvente de extracción: Para optimizar los disolventes del proceso de extracción se tuvieron en cuenta los pasos previos de optimización de los disolventes de acondicionamiento, carga, limpieza y elución tanto para el MIP como para el NIP que se obtuvieron en el capítulo 7. De acuerdo con esto, el disolvente utilizado como porógeno durante la polimerización era el más indicado para acondicionar el MIP, ya que es el más adecuado para permitir la unión del 1OHPyr en los sitios específicos de reconocimiento formados en el polímero. Para asegurar la completa eliminación de los interferentes que pudiesen quedar retenidos no específicamente sobre la microcolumna rellena por el MIP, se hizo pasar una disolución de lavado con la mezcla ACN:H₂O (95:5, v/v). Por último, el disolvente de elución era optimizado de acuerdo con su habilidad para romper las interacciones entre el analito y el polímero. La mezcla

del disolvente polar prótico MeOH y el polar aprótico, DCM, en proporción de volumen (85:15, v/v) fue la elegida para eluir el analito de la microcolumna.

- Diferentes concentraciones de 1OHPyr (10 a 400 $\mu\text{g/L}$) en ACN son preparadas para evaluar la concentración del analito en la etapa de carga. Después de esto, se prueban diferentes volúmenes de muestra (100, 250, 400 y 500 μL) y velocidad de flujo (0,2 a 1 mL/min). Finalmente, valores de 250 μL de una concentración 100 $\mu\text{g/L}$ fue considerada como óptimas para llevar a cabo el proceso de carga. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el proceso FIA se realizó empleando una velocidad de flujo de 1 mL/min. Ambas variables se seleccionaron manteniendo un compromiso entre la sensibilidad y el rendimiento de la muestra. Volúmenes mayores de 250 μL aumentaban la dispersión de la señal, mientras que volúmenes inferiores incrementaban la dilución de la muestra, disminuyendo la señal obtenida. Por otra parte, velocidades inferiores, ocasionaban una dispersión muy acusada, con picos anchos y mal definidos. En las condiciones optimizadas, la respuesta de la señal se producía en un intervalo corto de tiempo (respuestas del proceso completo menor a 1,5 minutos).

La Figura 8.8 muestra el perfil de respuesta para el 1OHPyr empleando las microcolumnas MIP y NIP en el sistema FIA. La elevada intensidad de fluorescencia obtenida en la señal correspondiente a la elución del 1OHPyr de la microcolumna formada por el MIP revela una alta captación del polímero por el analito comparado con el NIP. En el sistema FIA formado por la microcolumna conteniendo el NIP, el 1OHPyr no fue retenido, fluyendo junto con la disolución portadora y produciendo un bajo incremento de la intensidad de fluorescencia, que inmediatamente retornaba a la línea base. En el sistema FIA-MIP después de inyectar la muestra, el 1OHPyr queda totalmente retenido en el MIP, no observándose un incremento de la intensidad de fluorescencia. Seguidamente, cuando el eluyente atravesaba la microcolumna, se producía un rápido incremento de la señal que declinaba después de

alcanzar el máximo. Finalmente, la disolución portadora vuelve a atravesar el sistema otra vez, recuperando la línea base y regenerando el sistema para el próximo ensayo.

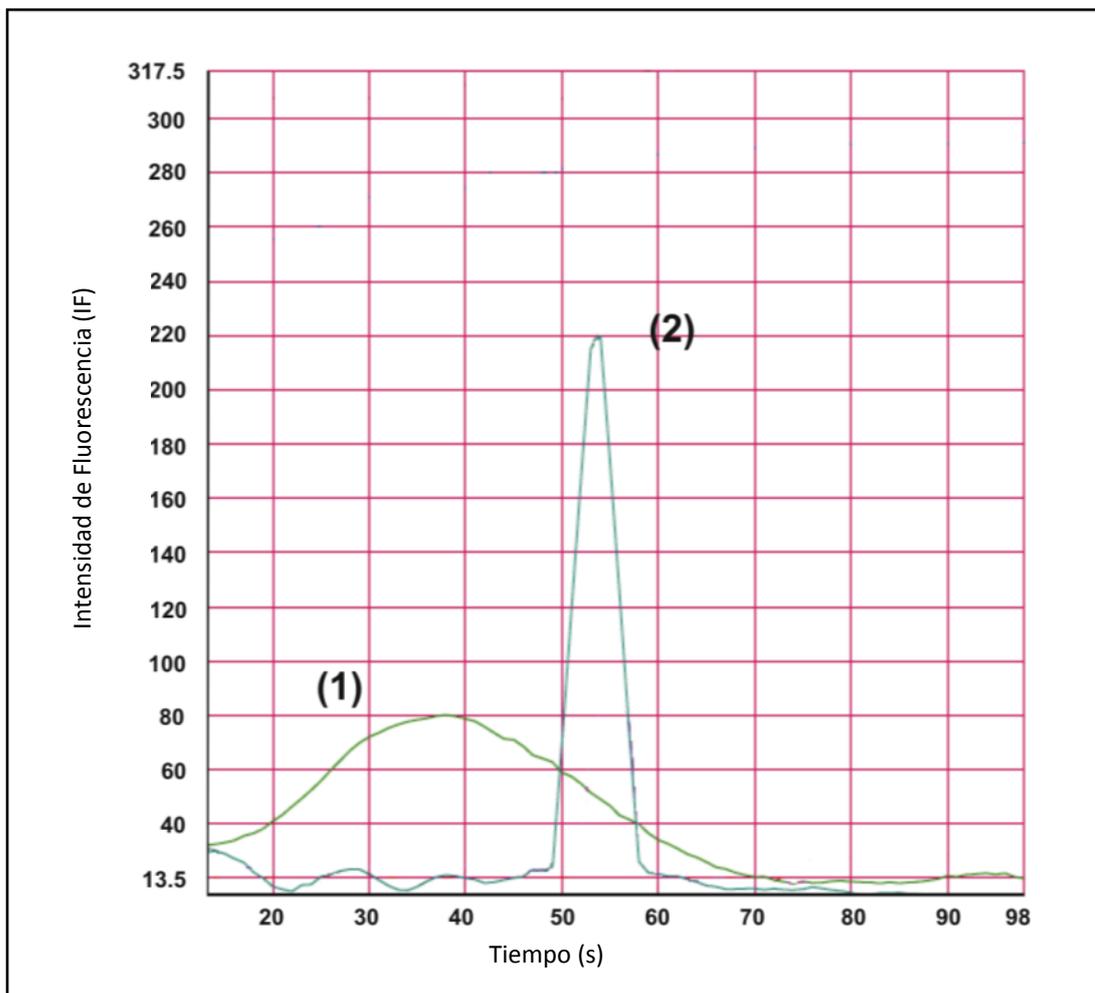


Figura 8.8. Perfil de respuesta del sistema FIA para la disolución estándar de 1OHPyr (100 µg/L) empleando una microcolumna conteniendo el NIP (1) y microcolumna conteniendo el MIP (2)

8.3.3. Aplicación del proceso FIA en muestras de orina. Validación del método

Las disoluciones de trabajo fueron preparadas dopando muestras de orina de recién nacidos con concentraciones crecientes de 1OHPyr en un rango de 10 a 400 µg/L, de acuerdo a valores analizados en sujetos expuestos ocupacionalmente [379].

La Figura 8.9 muestra la respuesta de la señal de la muestra sin microcolumna (1), la respuesta de la señal observada cuando se emplea el sistema FIA-MIP en la etapa de lavado (2) y en la etapa de elución (3).

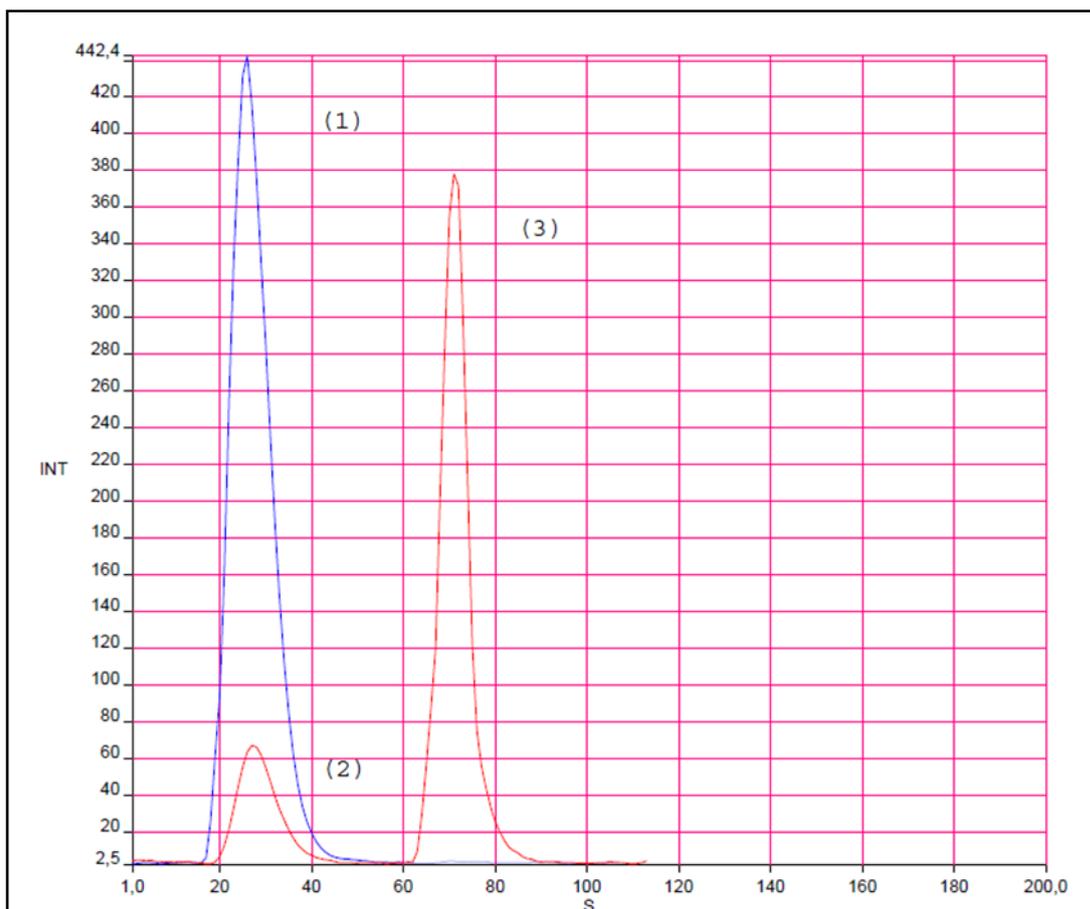


Figura 8.9. *Perfiles de respuesta del sistema FIA para el 1OHPyr (400 µg/L). Señal para muestras de orina sin columna (1), y empleando la microcolumna conteniendo el MIP: etapa de lavado (2) y etapa de elución (3)*

Se evaluaron a continuación las características analíticas del proceso. La curva de calibrado fue construida preparando muestras de orina de recién nacidos dopadas con concentraciones conocidas de disolución estándar de 1OHPyr en un intervalo de 10 a 400 µg/L. La recta de calibrado obtenida sería la siguiente: $y = 149,32 x + 72$, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,996. Los valores de LOD y LOQ fueron calculados a 3 y 10 en relación señal-ruido, respectivamente. El LOD obtenido fue de 3,1 µg/L y el LOQ fue 10,5 µg/L. La precisión en términos de RSD fue menor de 4,6%.

El método optimizado fue aplicado satisfactoriamente para la determinación del 1OHPyr en muestras de orina con recuperaciones en el rango comprendido entre el 74-85%. El

MIP aportaba, por tanto, una gran especificidad comparado con los adsorbentes tradicionales. La precisión del método fue evaluada con RSD en términos de reproducibilidad y repetibilidad. Los porcentajes de recuperación y precisión son mostrados en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Estudio de reproducibilidad y repetibilidad del método FIA-MIP

	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Precisión (%)	Recuperación (%) \pm SD
Reproducibilidad	10	3,77	84,88 \pm 5,03
	100	1,01	74,01 \pm 0,75
	400	4,43	80,98 \pm 3,59
Repetibilidad	10	0,48	85,17 \pm 3,42
	100	4,53	82,74 \pm 3,75
	400	4,47	81,46 \pm 3,86

Para realizar el estudio de interferencias, se tomó primeramente una disolución de 1 mL que contenía al 1OHPyr junto con cada uno de los cuatro isómeros del fenantreno (1OHPhe, 2OHPhe, 3OHPhe y 4OHPhe) a una concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ en ACN. Se inyectaron 250 μL al bucle de inyección a una velocidad de 1 mL/min.

En el procedimiento FIA, al no existir separación cromatográfica, el estudio de las interferencias se realizó comparando la señal obtenida para la muestra dopada con la disolución de 1OHPyr y la obtenida cuando también estaban presentes los isómeros de los hidroxilados del fenantreno. En este caso, la señal de emisión aumentaba respecto a la señal del 1OHPyr sola. Este hecho abre la posibilidad de poder aplicar este procedimiento como

método de cribado para la detección de la exposición a los HAPs, debido a que tanto el 1OHPyr como los OHPhe suelen estar presentes en la orina de la población expuesta.

Los sistemas FIA a los que se acoplan los sistemas de *on-line* de extracción de fase sólida para determinar HAPs no están muy extendidos. En este sentido, se han investigado polímeros de coordinación como sorbentes en métodos de inyección en flujo que combinan SPE acoplados con HPLC-UV para determinar HAPs en agua [405]. En otros estudios se han utilizado microcolumnas rellenas con otros sorbentes tales como partículas de C-30, fase estacionaria C-18 o lana de vidrio para determinar HAPs en suelos. [407]. Por otro lado, sólo se han publicado dos trabajos en los cuales se ha utilizado polímeros de impresión molecular para la determinación de metabolitos hidroxilados. Uno de los trabajos describe el empleo de un MIP para la extracción de los derivados de los PAHs entre los que incluye el 1OHPyr en muestras de suelo [235]. El otro artículo es la descripción del procedimiento MIPSPE recogido en el capítulo 7 de esta memoria [414].

8.4. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen del presente capítulo son:

- El procedimiento FIA-MIP propuesto es la primera aplicación de un sistema FIA en el cual se acopla una microcolumna empaquetada con un polímero de impresión molecular para la preconcentración, aislamiento y determinación del 1OHPyr en muestras de orina. El método descrito es simple, sensible y selectivo. Los tiempos de análisis obtenidos son muy cortos (inferiores a 1,5 minutos), con un alto intervalo de linealidad comprendido entre los 10-400 µg/L. Además, la manipulación de la muestra es mínima, por lo que evitando el contacto con la misma se disminuyen las posibilidades de pérdida de analito.

- Los espectrofluorímetros son equipos empleados usualmente en laboratorios de rutina, y no requieren de personal altamente cualificado para su empleo.
- Este método proporciona buenas recuperaciones y ofrece la posibilidad de añadir nuevas estrategias de automatización y acoplamiento a otras técnicas.
- El sistema puede ser fácilmente empleado como método de *screening* para evaluar la exposición ambiental y ocupacional en determinados estudios de biovigilancia.
- Respecto a la selectividad del método, la presencia de los isómeros hidroxilados del Phe produce importantes variaciones en la señal. Sin embargo, este hecho puede ser utilizado para determinar la concentración de estos metabolitos.
- El sistema FIA propuesto puede ser fácilmente utilizado como un método de cribado para evaluar la exposición a los HAPs en población general o en trabajadores expuestos.
- La tendencia en el desarrollo de los métodos de análisis por inyección en flujo está dirigida a disminuir los pasos de pretratamiento de la muestra y a miniaturizar los sistemas automatizados. De esta forma se potencia que los errores de manipulación sean menores y aumente la precisión de los resultados.
- Permite llevar a cabo varias determinaciones de una misma muestra en un tiempo menor de análisis, disminuyendo la cantidad de reactivos necesarios y por lo tanto de desechos disminuyendo, en consecuencia, los costes totales del análisis.
- La mayoría de las investigaciones en Química Analítica están enfocadas a mejorar la calidad en los resultados analíticos. El FIA es una de las técnicas en la que este objetivo se puede cumplir de una forma sencilla, por lo que el método propuesto puede ser

una buena alternativa en la determinación de los metabolitos hidroxilados de los HAPs en orina.

9. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD) PARA LA DETERMINACIÓN DE 1-HIDROXIPIRENO EN MUESTRAS DE LECHE

9.1. INTRODUCCIÓN

Aunque las principales rutas de eliminación de los HAPs son la orina y las heces, también son excretados en la leche. Por otra parte, la concentración de 1OHPyr encontrada en la orina es 10 veces mayor que la hallada en leche [47] y debido a este hecho, en general, los estudios de biovigilancia se han realizado en orina. La excreción de los metabolitos de los HAPs ha sido hasta la fecha poco estudiada en leche, destacando en este aspecto los trabajos de varios autores sobre esta matriz en rumiantes [38, 40-43, 47, 415]. Tampoco hay demasiados estudios realizados en leche humana con la sensibilidad suficiente para determinar estos analitos a nivel de traza [304].

Por otro lado, a diferencia de la orina, la leche es una matriz mucho más compleja que contiene un gran número de sustancias que pueden interferir en el análisis instrumental, principalmente proteínas y materia grasa. En la mayoría de los métodos publicados donde la matriz es leche, los tiempos de pretratamiento son largos e incluyen la desproteínización, eliminación de grasa de la muestra o diferentes procedimientos de limpieza [46, 53, 416]. Para este tipo de muestras, el uso de la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) ofrece una alternativa efectiva a los métodos tradicionales de preparación de muestra [211]. Esta metodología combina aspectos de otras técnicas, como la disrupción y dispersión de los componentes de la muestra dentro de un soporte sólido, generando un material cromatográfico cuya composición permite la extracción de los componentes dentro de la muestra dispersa.

Una de las ventajas que presentan las técnicas de adsorción, como la MSPD, sobre otras técnicas de extracción es la disponibilidad de emplear diferentes adsorbentes. El desarrollo de la MSPD en este sentido ha permitido el uso de nuevos soportes sólidos y fases orgánicas novedosas con características físico-químicas diferentes a los adsorbentes comerciales. De esta manera se puede aumentar la selectividad en las extracciones favoreciendo las interacciones con el analito o los componentes de la matriz [417-419].

La técnica de dispersión de matriz en fase sólida o MSPD fue introducida por Barker en 1989 [297, 417]. Es una técnica de extracción, purificación y preparación de muestra ampliamente empleada en un gran número de sustancias, sólidas, semisólidas o viscosas en diferentes matrices que aísla y preconcentra los analitos de la matriz de la muestra por adsorción sobre una fase sólida [420, 421]. Sus principios físico-químicos están basados en la completa disrupción de la muestra, permitiendo a los componentes de la misma dispersarse y disgregarse en una fase orgánica que actúa como soporte sólido, generando de forma simultánea un material que posee el carácter cromatográfico suficiente para la extracción de los componentes y analitos de una muestra dada. Este soporte actúa como agente abrasivo, provocando la ruptura mecánica de la estructura de la matriz y consiguiendo su distribución sobre las partículas de adsorbente. Además, la presencia de una fase orgánica enlazada en el soporte sólido proporciona una dimensión adicional al proceso, puesto que los componentes de la muestra se disuelven y dispersan en su superficie. Así, a través de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los diferentes componentes de la muestra sobre la superficie de la fase enlazada, se produce una fase con características únicas, que permite llevar a cabo la extracción del analito de interés [422]. Con la disrupción y disgregación de los componentes se produce además, un aumento del área de la superficie que puede estar en contacto con la muestra [423]. La alta eficiencia del proceso de transferencia de masa explica las altas recuperaciones obtenidas con bajos volúmenes de disolvente [424].

La MSPD se suele emplear con aquellas muestras que pueden causar problemas con otras técnicas o complicar las etapas previas, como pueden ser muestras biológicas o con alto contenido en grasa, ya que mediante la MSPD se evita la formación de emulsiones o partículas suspendidas, que podrían ocupar los espacios entre los poros de la fase sólida, impidiendo el flujo del eluyente como podría suceder en el caso de la SPE [425]. La MSPD no sólo realiza la extracción del analito, sino también la limpieza simultánea del extracto. Con objeto de incrementar dicha limpieza, en algunos casos se empaqueta primero un pequeño lecho de sorbente de distinta polaridad lo que permite obtener secuencialmente distintas fracciones ricas en un determinado tipo de compuestos mediante el empleo de disolventes de polaridad creciente. El eluato así obtenido puede ser directamente analizado o bien incluir algún paso previo como una SPE o filtrado de la muestra.

Otras ventajas adicionales de la extracción MSPD son [420, 426, 427]:

- Bajo coste por extracción
- Sencillez y flexibilidad
- Rapidez
- No necesita instrumentación costosa
- Disminución del consumo de disolventes

Entre sus desventajas [428]:

- La necesaria manipulación de la muestra.
- Las variables a optimizar (diámetro de partícula, carácter de la fase ligada, soporte sólido, relación muestra/material sólido, secuencia de elución y volumen del mismo, efecto matriz) [417].
- Dificultad para automatizar el proceso.

Experimentalmente, en un proceso MSPD, una pequeña cantidad de muestra es dispuesta en un mortero con una determinada cantidad de soporte sólido y fase ligada donde son mezclados mecánicamente hasta que la muestra queda completamente dispersa produciéndose la ruptura de los compuestos. El material así mezclado es transferido y empaquetado en una columna o cartucho de extracción, que contiene en el fondo lana de vidrio u otro material para contener la mezcla. El empaquetamiento se lleva a cabo teniendo en cuenta los principios cromatográficos básicos, como evitar canales o compactar demasiado el material para evitar sobrepresiones, etc. Una vez empaquetada la mezcla, ya se puede proceder a la extracción de los analitos. Este proceso puede hacerse, bien por quedar los analitos retenidos en la columna y las interferencias ser eluidas en una etapa previa de lavado (posteriormente habrá que eluir los analitos con los disolventes adecuados), o bien quedar retenidas las interferencias de la matriz selectivamente en la columna, quedando los analitos de interés libres de ser eluidos con el disolvente adecuado. Esta segunda opción evita pasos previos. El proceso que se lleva a cabo es un equilibrio de partición y adsorción, similar a lo que ocurre en la cromatografía de columna. Estos equilibrios son responsables de la distribución del analito entre la fase dispersa y el solvente de elución [429]. La Figura 9.1 esquematiza el proceso MSPD anteriormente descrito.

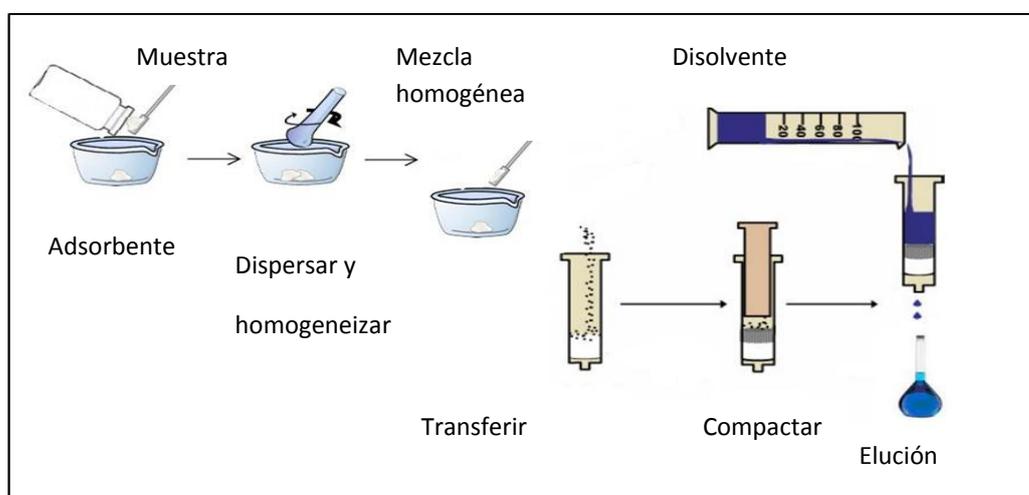


Figura 9.1. Esquema del procedimiento MSPD

En las últimas décadas, la MSPD ha sido ampliamente utilizada como técnica de limpieza, aislamiento y preconcentración para todo tipo de analitos en todo tipo de muestras vegetales y animales, incluida la leche [417, 427, 430, 431]. También, la MSPD se ha utilizado como técnica de extracción en la determinación de HAPs en muy variadas matrices, desde lodos, o suelos, alimentos como la miel o el aceite, tejidos humanos, hasta biota (bivalvos, mejillones), o cultivos de microalgas [298-301, 432-435].

La principal innovación en el empleo de la MSPD concierne sobre todo a la mejora de nuevos materiales dispersantes, como pueden ser los MIP [211]. Sin embargo, a pesar de las numerosas aplicaciones de esta técnica, las investigaciones relacionadas con el desarrollo o aplicación de nuevos adsorbentes o fases enlazadas novedosas son escasas [417]. Como nuevos materiales se han propuesto fibras de carbono [419], alúmina [436], carbón grafitado [437], líquidos iónicos [438, 439], nanopartículas [440, 441] o materiales poliméricos como los MIP [423]. Los MIP, al ser sintetizados en presencia del analito plantilla, mantienen la habilidad de reconocer específicamente el analito, diferenciándola de otra molécula análoga, por lo que pueden aplicarse para mejorar la selectividad de los materiales en técnicas de extracción. En este sentido, diferentes MIP han sido utilizados como adsorbente en MSPD obteniéndose resultados prometedores ya que con su utilización se mejora la recuperación de los analitos con respecto a otros materiales, aumentando la selectividad al eliminar también la posibilidad de interferencias [212, 442, 443]. Así pues, la síntesis de materiales basados en la impresión molecular apunta la posibilidad de diseñar soportes sólidos para MSPD con afinidad y selectividad hacia un analito o grupo de analitos cuya estructura química está relacionada con la plantilla.

A pesar de los avances en las aplicaciones de la MSPD, en la bibliografía no se ha hallado ningún procedimiento para determinar los metabolitos de HAP en leche, orina u otras matrices. Como se ha mencionado anteriormente, sí se han analizado HAPs en bivalvos [432],

muestras de pescado [444], lodos [298] o suelos [300]. Mediante esta técnica de extracción, y empleando una pequeña cantidad de muestra, se han podido aislar y preconcentrar, por citar algunos ejemplos, antraceno, fluoranteno, B[a]Pyr o B[a]A. Los procedimientos descritos son rápidos y simples, con un bajo consumo de disolventes, en los cuales se ha reducido drásticamente la etapa de extracción.

En la presente investigación para la determinación de 1OHPyr se han desarrollado varios procedimientos MSPD para muestras de leche humana. También otros procedimientos han sido propuestos utilizando la extracción MSPD acoplada a un MISPE, o utilizando un polímero de impresión molecular como adsorbente en la mezcla MSPD (MIP-MSPD) para la determinación de 1OHPyr en muestras de leche materna.

9.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

9.2.1. Procedimiento cromatográfico

Las condiciones cromatográficas para la determinación de 1OHPyr son las mismas que las empleadas en el anterior capítulo. Se ha utilizado una fase móvil isocrática formada por MeOH/H₂O en proporción (88:12,v/v), una velocidad de flujo 1 de mL/min, $\lambda_{exc}/\lambda_{em}=242/388$ y ganancia de 10 para el detector de fluorescencia. La muestra se inyectó manualmente empleando un bucle de inyección de 20 μ L. El equipo utilizado fue un HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity con columna ZORBAX Eclipse PAH (4,6x150 mm, 3.5 μ m). Previa a la columna se acopló una pre-columna empaquetada del mismo material para salvaguardarla. El detector de fluorescencia fue un Hewlett Packard 1046. Todo el equipo fue controlado por el software Chemstation de Agilent Technologies preparado para HPLC-FD.

9.2.2. Procedimiento MSPD convencional en muestras de leche materna

En el presente capítulo de esta Tesis Doctoral se pretende aplicar la metodología MSPD a la determinación del compuesto 1OHPyr en una muestra compleja, como es la leche materna. En primer lugar se llevará a cabo un tratamiento de muestra en el que se empleará un procedimiento MSPD convencional, optimizando las variables que afectan a dicho proceso. Seguidamente, se evaluará la posibilidad de implementar el uso de los polímeros de impresión molecular en el proceso MSPD. Para ello, se seguirán dos estrategias diferentes. La primera de ellas se basa en el uso combinado de un cartucho MSPD y un cartucho MISPE (MSPD-MISPE). La segunda estrategia consiste en utilizar el MIP como un soporte sólido más (MIP-MSPD), evaluando el potencial de combinación MSPD con MISPE. Así se desarrollará un método rápido, versátil, selectivo y sensible para preparar la muestra de leche y determinar 1OHPyr eliminando los posibles interferentes. Por otra parte esta estrategia permite preservar el polímero de impresión molecular para posteriores usos.

Para la preparación de la MSPD se tomó un volumen 250 μ L de muestra dopada con la correspondiente concentración de 1OHPyr. Posteriormente, en un mortero de vidrio se vertieron, como dispersante, 1 g de arena de mar lavada de tamaño 0,25-0,30 mm (Panreac, España) más 1 g de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) (Panreac, España), que actuaron como soporte sólido [442, 445]. Junto con la muestra, la mezcla se trituró en el mortero durante 10 minutos hasta que se obtuvo una composición de material completamente seca y homogénea, produciéndose la disrupción y dispersión de la muestra en el soporte sólido. La mezcla se dejó reposar durante 15 minutos siendo transferida a una columna de vidrio de 3 mL de capacidad semejante a la utilizada en SPE.

Para evitar pérdidas del soporte y albergar el material se dispuso en el fondo de la columna SPE un pedazo de lana de vidrio. La mezcla se compactó mecánicamente con ayuda

de un émbolo para evitar posibles caminos preferentes en el empaquetamiento. Por encima del material se añadió una pequeña cantidad de Na_2SO_4 como material higroscópico. La elución del analito se efectuó con 3 mL de MeOH en tres etapas (3 x 1 mL) con ayuda de una válvula de Teflón que mantuvo el flujo en 1 mL/min aproximadamente. Los extractos son recolectados, filtrados con filtro de 0,45 μm de tamaño de poro y 3 mm de diámetro, evaporados bajo corriente suave de nitrógeno a temperatura ambiente y reconstituidos para proceder al análisis cromatográfico.

Todas las muestras de leche materna se preservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.-En ese momento la leche es homogeneizada a temperatura ambiente, se dopa con la concentración adecuada y se procede a aplicar el proceso de preparación de muestra.

9.2.3. Procedimiento MSPD combinado con MISPE en muestras de leche materna

En este procedimiento se combina la MSPD, para llevar a cabo la extracción del analito, con el proceso MISPE, que permitirá realizar la limpieza de la muestra, y poder determinar 1OHPyr en muestras de leche materna, intentando unir la versatilidad y flexibilidad del proceso MSPD y la selectividad del MISPE.

Para ello, se prepara un cartucho MSPD, al igual que en el apartado anterior, con las mismas características que el preparado en el ensayo descrito. Paralelamente, con el polímero de impresión molecular sintetizado por precipitación, se prepara un cartucho de extracción MISPE (ver capítulo 7).

Este proceso se llevó a cabo en dos etapas. En la primera de ellas, se siguió el protocolo anteriormente descrito para MSPD, es decir, se tomó un volumen de 250 μL de leche materna dopada con la correspondiente concentración de 1OHPyr. Se dispusieron en un mortero 1 g de arena de mar lavada de tamaño 0,25-0,30 mm, más 1 g de Na_2SO_4 . Se adicionó

la muestra siendo la mezcla triturada durante 10 minutos, dejándose reposar durante 15 minutos y siendo transferida a una columna de vidrio de 3 mL de capacidad albergada entre lana de vidrio para evitar pérdidas de material. Una vez la mezcla dispuesta en el cartucho, se compactó y se añadió por encima una pequeña cantidad de Na_2SO_4 como material higroscópico. La elución del analito se efectuó con 3 mL de MeOH en tres etapas (3 x 1 mL) con ayuda de una válvula de Teflón que mantuvo el flujo en 1 mL/min aproximadamente. Los extractos son recolectados y filtrados para posteriormente participar del proceso MISPE.

En una segunda etapa, se tomó una alícuota 200 μL del eluato obtenido en el proceso de extracción MSPD, y se cargó en el cartucho MISPE, previamente acondicionado con 800 μL de ACN. Tal y como se realizó en el procedimiento MISPE anteriormente optimizado y descrito en el capítulo 7. El lavado se realizó con 100 μL de una mezcla de disolventes ACN:H₂O (95:5, v/v) y la elución del analito con un volumen de 4x100 μL de la mezcla MeOH:DCM (85:15, v/v).

Igual que en los procedimientos anteriores, los extractos son recolectados, filtrados con filtro de 0,45 μm de tamaño de poro y 3 mm de diámetro, siendo posteriormente reconstituidos para proceder al análisis cromatográfico mediante HPLC-FD.

Posteriormente, se limpió cuidadosamente el cartucho MISPE con una mezcla MeOH y MeOH:ácido fórmico al 1% asegurando la completa limpieza de éste.

9.2.4. Procedimiento MIP-MSPD en muestras de leche materna

La segunda estrategia para incorporar los MIP al tratamiento de muestra junto con la MSPD estuvo basada en incluir el MIP como adsorbente dispersante, optimizando las cantidades de muestra y dispersante. Para ello se tomaron 0,048 g de MIP sintetizado por precipitación (ver capítulo 6) junto con 0,252 g de Na_2SO_4 y 0,252 g de arena de mar lavada. El volumen de muestra fue de 200 μL . Todo ello se dispuso en un mortero de vidrio triturándose, como en el proceso anterior, durante 10 minutos hasta que la mezcla estuvo completamente

seca y homogénea, habiéndose producido la disrupción y dispersión de la muestra en el soporte sólido. Se dejó reposar durante 15 minutos y se transfirió a una columna de vidrio de 3 mL de capacidad. De igual forma, se añadió por encima una pequeña cantidad de Na₂SO₄. El material se albergó entre lana de vidrio compactándose con ayuda de un émbolo. La elución del analito se efectuó con 3 mL de una mezcla MeOH:DCM (85:15 v/v) con ayuda de una válvula de Teflón a un flujo aproximado de 1 mL/min. Los extractos son recolectados, filtrados con ayuda de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro, siendo posteriormente reconstituidos y analizados con ayuda del HPLC-FD.

9.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

9.3.1. Optimización de las etapas del proceso MSPD convencional para leche materna

Para la optimización de la extracción MSPD habrá que tener en cuenta una serie de factores. Estos son [417]:

- Diámetro de partícula: Las partículas muy pequeñas requieren largos tiempos de elución y grandes presiones.
- Carácter de la fase ligada: Dependiendo de la polaridad de la fase elegida, las aplicaciones que necesitan fases ligadas lipofílicas deben usar materiales intercambiadores como el C-18.
- El soporte sólido a utilizar: Con este fin se han encontrado en la bibliografía diferentes materiales, como la sílice derivatizada y sin derivatizar, octadecilsilano (ODS), gel de sílice, arena, florisil, fibras de carbono, MIP, alúmina, etc. [446]. Las propiedades morfológicas y mecánicas del soporte inorgánico así como su comportamiento químico son de gran importancia. Las fuerzas mecánicas que resultan de la trituración de la muestra en presencia del adsorbente facilitan la disgregación de la muestra en partículas más pequeñas, y por otro lado, los grupos funcionales presentes en el

adsorbente actúan como un solvente que “disuelve” y dispersa los componentes de la muestra aumentando el área superficial para la extracción. La matriz química de la muestra se distribuye sobre la superficie del soporte sólido en función de sus polaridades relativas.

- Relación muestra/material sólido. La proporción más aplicada es la 1:4, pero es un factor clave a optimizar y debe ser evaluado durante el desarrollo del método. La mayoría de los protocolos incluyen como soporte sólido el uso de una fase lipofílica unida (C-18, C-8), mezclado con la muestra en una relación 1:4 [426].
- Elección de la secuencia de elución y su volumen: La matriz de la muestra se distribuye sobre la superficie del soporte sólido según su polaridad relativa. Los compuestos no polares se dispersan en la fase orgánica inmobilizada, las moléculas pequeñas y muy polares pueden asociarse a los grupos silanol presentes en la superficie o dentro de los poros de la partícula de sílica, así como a aquellos componentes de la muestra capaces de formar puentes de hidrógeno. De igual forma las moléculas de mayor tamaño y polaridad intermedia se distribuyen a través de la estructura formada por la muestra dispersa y la fase orgánica inmobilizada [429]. Por tanto, la selección de los disolventes de elución estará marcada por la polaridad del analito. El disolvente competirá con los analitos por los sitios activos del sorbente, teniendo en cuenta que cuanto más polar sea el disolvente, mayor poder de elución presentará. Esta composición contribuye a reducir la grasa de matrices complejas, cuando se usan disolventes polares como extractantes.
- Efecto de la matriz: debido a que todos los componentes son dispersados en la columna pudiendo formar una nueva fase que puede repercutir en el aislamiento del analito.

Por lo tanto, la eficiencia de la MSPD depende del cuidado en la optimización de las distintas condiciones experimentales que afectan la competencia entre la matriz, los dispersantes o soportes sólidos, y los eluyentes de los analitos, teniendo en cuenta además, los posibles interferentes. Consecuentemente, en la investigación desarrollada en esta parte de la memoria que se presenta, cada uno de estos factores, como sería el tipo de sorbente, la proporción muestra/sorbente y las diferentes condiciones de elución, han sido optimizados y seleccionados para conseguir extractos con el mayor grado de recuperación, y el menor número de interferentes en muestras de leche, muestras complejas seleccionadas para llevar a cabo esta parte de la investigación, dada la importancia de las mismas en estudios de biovigilancia.

Elección del soporte sólido

La naturaleza del soporte sólido afectará a la retención y elución de los analitos y de los correspondientes componentes de la muestra. Convencionalmente se ha empleado C-18, alumina, o Florisil como dispersante. En base a la revisión bibliográfica realizada, la primera elección fue C-18, ampliamente utilizado como soporte en numerosos trabajos en muestras de leche [447-449]. Por tanto, para preparar la MSPD se tomaron 1 g de C-18 (Supelco Sigma-Aldrich, Madrid), junto con 1 g de Na_2SO_4 y la alícuota de la muestra dopada con el analito de interés. La mezcla se trituroó en el mortero durante 10 minutos hasta que se obtuvo una composición de material completamente seca y homogénea, produciéndose la disrupción y dispersión de la muestra en el soporte sólido. La mezcla se dejó reposar durante 15 minutos, siendo transferida a una columna de vidrio de 3 mL de capacidad similar a la empleada en SPE. Se evaluó la elución del analito empleando diferentes volúmenes de MeOH. Los extractos obtenidos contenían un gran número de interferencias y las recuperaciones del analito no superaron el 56%. Estos datos de recuperación podrían ser debidos a la fuerte retención que

ejerce el C-18 sobre el analito, por lo que se pensó en utilizar un material inerte como la arena de mar como soporte sólido para las muestras de leche.

Relación muestra/soporte

El siguiente paso fue seleccionar la proporción de muestra/soporte adecuada que permitiese la completa adsorción de los componentes de la matriz favoreciendo la transferencia de masa dentro del cartucho MSPD. En este estudio, empleando como soporte sólido arena de mar y Na_2SO_4 , se evaluaron diferentes cantidades de muestra empleando varias proporciones muestra/soporte, para obtener una mezcla sin humedad que mejorase la disrupción de los componentes. Se probaron diferentes composiciones en relación muestra/soporte como la 1:1 1:2 o 1:4. Con las dos primeras, no resultaba una mezcla lo suficientemente seca para empaquetar. Finalmente, una cantidad de muestra de 250 μL dispersada en 1 gramo de arena lavada y 1 gramo de Na_2SO_4 (1:4), dio como resultado una mezcla homogénea y seca, cuyo empaquetamiento permitía el flujo de disolvente a su través.

Etapas de lavado

Dado el alto contenido en materia grasa y la presencia de proteínas de la muestra seleccionada, se pensó en la posibilidad de incluir una etapa de lavado de la muestra (desproteínización y desgrasado), tal y como han hecho otros autores en trabajos recientemente publicados [442, 445, 450] como etapa previa a la elución. Para ello, se utilizó un disolvente de carácter apolar, tal como el hexano. También se probó la opción de emplear una disolución de hidróxido sódico para eliminar la grasa de la muestra, llevando a cabo ensayos con diferentes volúmenes y concentraciones. Tras esta etapa de lavado o limpieza de la muestra, se procedió a continuar con la elución del analito, que se realizó con 3 mL de MeOH (3 x1 mL). Los extractos fueron tratados de la misma forma anteriormente descrita para su cuantificación mediante HPLC-FD. Los resultados obtenidos muestran una pérdida de

analito alrededor del 45-52% cuando se lava con hexano en la recuperación final, con lo que se estudió la posibilidad de eliminar esta etapa de lavado o limpieza en los siguientes ensayos, realizando directamente la etapa de elución.

Optimización de la elución

La elección del disolvente de elución adecuado es un aspecto importante, ya que el analito de interés debe ser desorbido, mientras que el resto de los compuestos de la matriz deben ser retenidos en la columna formada, eliminando de esta manera los interferentes de los extractos finales. El tipo de disolvente adecuado es primeramente elegido por su polaridad. Consecuentemente, diferentes mezclas de disolventes como MeOH:ACN (50:50, v/v), MeOH:DCM (85:15, v/v) y MeOH fueron probados para optimizar el procedimiento directo de elución.

La optimización del disolvente de elución se llevó a cabo tomando 250 μ L de leche materna con la correspondiente cantidad de analito. En el mortero se añadió la muestra, 1 g de arena de mar y 1 g de sulfato de sodio anhidro. La mezcla se trituró durante 10 minutos en el mortero hasta obtener un material seco y homogéneo. Se dejó reposar durante 15 minutos traspasándose a una columna de SPE. Se llevó a cabo la etapa de elución, empleando 3 mL (1 x 3 mL) de cada uno de los disolventes y mezclas seleccionados. Se probaron diferentes disolventes de elución y volúmenes de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.2.

En estos experimentos, las mejores recuperaciones fueron obtenidas cuando se utilizó MeOH como eluyente, mostrando gran efectividad en las recuperaciones del analito (mayores del 90 %). Sin embargo, en las mezclas de metanol con disolventes menos polares o apolares, no se conseguía la elución cuantitativa del 1OHPyr.–Por tanto, se seleccionó metanol como disolvente óptimo para la etapa de elución.

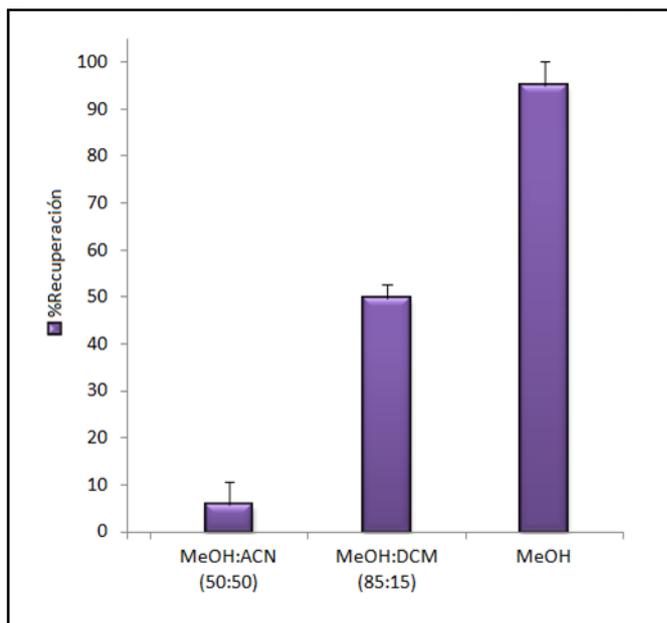


Figura 9.2. Recuperación del analito empleando diversos eluyentes

Con la finalidad de aumentar la recuperación del 1OHPyr, se optimizó la cantidad de eluyente a utilizar. Para ello, se evaluaron diferentes volúmenes de MeOH 0,5 a 5 mL, encontrándose como volumen óptimo de extracción 3 mL, pero realizada dicha operación en 3 etapas (3 x 1 mL). Volúmenes por debajo de este valor daban una incompleta elución del analito y volúmenes mayores no tenían como resultado una mayor recuperación del mismo. La elución se llevó a cabo por gravedad con un flujo constante de 1 mL/min aproximadamente. Las recuperaciones obtenidas fueron del 91-99% con una RSD < 8% en muestras de leche.

En la Figura 9.3 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos tras someter la muestra de leche a un proceso de extracción MSPD, permitiendo la determinación del 1OHPyr con un sencillo y rápido procedimiento.

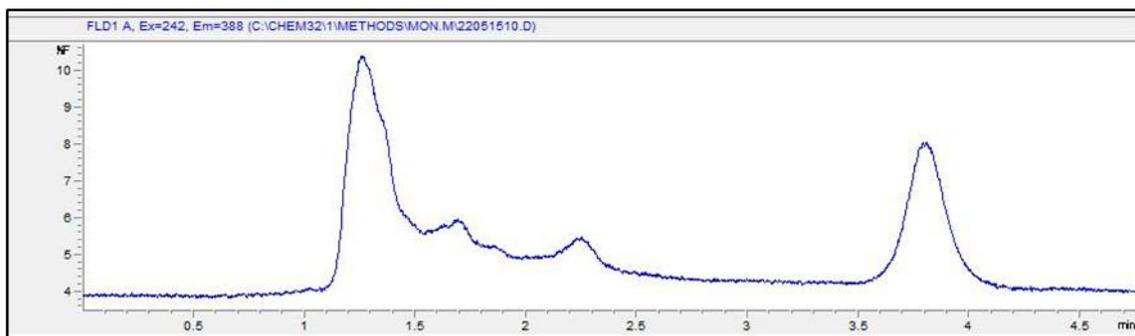


Figura 9.3. Cromatograma de 2 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr en muestras de leche tras la MSPD

9.3.2. Optimización de las etapas del proceso MSPD combinado con MISPE en leche materna

Los primeros ensayos para implementar el MIP en un proceso MSPD se basaron en el uso de un procedimiento MISPE empleado como etapa de limpieza posterior a un proceso de extracción MSPD. Para investigar esta estrategia se prepararon, siguiendo los protocolos descritos anteriormente, un cartucho de extracción MISPE con un MIP sintetizado por precipitación y un cartucho MSPD preparado con muestra de leche materna dopada con 1OHPyr.

Para el primer ensayo se tomaron 250 μL de leche dopándola con 0,25 $\mu\text{g/L}$ de 1OHPyr. Se siguió el mismo procedimiento descrito para la realización de la MSPD convencional, obteniéndose un eluato que fue posteriormente depositado sobre el cartucho MISPE previamente preparado y acondicionado con 800 μL de ACN, para llevar a cabo una etapa posterior de limpieza de la muestra. La carga se realizó con 200 μL de la fracción anterior recolectada manteniéndose durante 5 minutos para permitir que todo el polímero estuviese en contacto con la muestra. En este caso se observó que el cartucho MISPE quedaba atascado, debido seguramente a la naturaleza de la matriz, siendo imposible la elución del analito.

Se limpió cuidadosamente el cartucho MISPE con una mezcla MeOH y MeOH/ácido fórmico al (99:1, v/v) y se acondicionó de nuevo con 200 μL de ACN, quedando así preparado

para iniciar un nuevo ensayo. En este caso, la etapa de limpieza *post*-MSPD se llevó a cabo filtrando el eluato obtenido con un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro antes de introducirlo en el cartucho MISPE. Se siguió el mismo procedimiento de lavado y elución descrito anteriormente, (lavado con 100 μL de ACN:H₂O 95:5, v/v, y elución con 100 μL de MeOH:DCM 85:15, v/v). La inclusión del filtrado del eluato procedente de la MSPD permitió llevar a cabo el proceso MISPE completo y la cuantificación del analito, obteniéndose unas recuperaciones del 27,3%.

Debido a lo laborioso del procedimiento y a las bajas recuperaciones obtenidas, se abandonó esta línea de investigación, para proceder con la segunda estrategia comentada.

9.3.3. Optimización de las etapas del proceso MIP-MSPD en leche materna

El procedimiento denominado en esta Tesis Doctoral MIP-MSPD tiene como objetivo utilizar el polímero específico para el 1OHPyr, ya sintetizado y caracterizado, como soporte sólido en un proceso de extracción MSPD, con el propósito de mejorar la extracción selectiva del analito en las muestras de leche materna. Esta estrategia está basada en el uso de un MIP como adsorbente dispersante en el proceso MSPD. El MIP va a aportar al soporte sólido su capacidad de reconocimiento específico hacia el 1OHPyr, molécula molde para la que fue sintetizado, aumentando con ello la selectividad del análisis y eliminando los posibles interferentes presentes en la muestra. Sus propiedades de reconocimiento ya fueron estudiadas en el capítulo 7.

Para preparar el soporte sólido de la MSPD se utilizó el MIP sintetizado por precipitación, más la arena de mar y el sulfato sódico utilizados en los anteriores experimentos. Debido a que estos procedimientos son destructivos y los costes económicos de los reactivos elevados, las optimizaciones previas se realizaron con el polímero no impreso sintetizado por precipitación (NIP_{prec}).

Por otra parte, la limitada cantidad de polímero disponible hizo que la primera variable a optimizar fuese la relación muestra/soporte.

Para los primeros ensayos se tomó una alícuota de 200 μL de leche dopada con la correspondiente concentración de analito y se llevó a un mortero de vidrio junto con 0,084 g del polímero no impreso NIP_{precip}, 0,126 g de Na_2SO_4 y 0,126 g de arena de mar. Se procedió de la misma forma que en el procedimiento MSPD convencional, descrito anteriormente, mezclando y disgregando la muestra. La mezcla formada cuya proporción NIP: Na_2SO_4 : arena de mar era 1:3:3 resultó demasiado húmeda para ser transferida al cartucho por lo que se probaron distintas proporciones de los diferentes componentes de la mezcla, conservando la cantidad de NIP_{precip} hasta conseguir una mezcla con las características adecuadas para ser utilizada en un proceso MSPD. Finalmente, se encontró que duplicando las cantidades de Na_2SO_4 y de arena de mar, se obtuvo una mezcla lo suficientemente homogénea y seca como para llevar a cabo el procedimiento de extracción MSPD. Así, una vez optimizadas estas cantidades, dichos componentes se mezclaron y disgregaron transvasándose a un cartucho de extracción.

Dada la complejidad de la muestra de leche, y con objeto de eliminar todos aquellos compuestos que no hubiesen sido retenidos específicamente por el polímero, se procedió a estudiar la posibilidad de emplear una etapa de limpieza, previa a la elución, para así dejar el cartucho MIP-MSPD libre de interferentes.

El estudio de la etapa de limpieza se llevó a cabo empleando diferentes disolventes de diferente polaridad, tales como agua, acetonitrilo, hexano y cloroformo, así como mezclas de los mismos en distintas proporciones. Los ensayos se realizaron empleando 1 mL de disolvente de lavado. La elución del analito del cartucho MIP-MSPD tras la etapa de lavado o limpieza se

realizó inicialmente con 3 mL de MeOH. Las mejores recuperaciones fueron obtenidas cuando se utilizó en la etapa de lavado 1 mL de ACN.

En el siguiente paso, se procedió directamente a evaluar la elución del analito de interés utilizando 3 mL de MeOH en tres etapas (3 x 1mL). Las recuperaciones del analito así obtenidas fueron del 86 %.

Para mejorar y optimizar estos resultados, se modificó el disolvente de elución, probando la mezcla MeOH:DCM (85:15, v/v) que ya había sido previamente empleada en los estudios MISPE del capítulo 7, así como otros disolventes (MeOH:ACN, 80:20, v/v, ACN:H₂O, 80:20, v/v, MeOH). El uso de la gran mayoría de los disolventes no mejoró los resultados obtenidos, a excepción del DCM. La inclusión de este disolvente mezclado con MeOH en la etapa de elución mejoraba la limpieza de los extractos probablemente debido a que reducía la coextracción de los lípidos [428]. Las recuperaciones en este caso se situaron en el intervalo del 91-99 % con una RSD < 8%. Por ello, se consideró la mezcla MeOH:DCM (85:15, v/v) como eluyente óptimo para llevar a cabo la etapa de elución en el proceso MIP-MSPD desarrollado.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir entonces que la metodología MIP-MSPD constituye un método de preparación de muestra consolidado. El empleo del MIP como material dispersante permite aislar el analito de la muestra selectivamente a nivel de traza. La Figura 9.4 muestra el cromatograma obtenido tras someter una muestra de leche al proceso MIP-MSPD anteriormente descrito. Como puede observarse, empleando esta metodología se obtienen recuperaciones del mismo orden que en la metodología descrita en el apartado anterior, (9.3.1. Optimización de las etapas del proceso MSPD convencional para leche materna). En cambio, si se comparan los cromatogramas obtenidos en ambos procesos (Fig 9.3 y Fig 9.4), se ve claramente como el frente cromatográfico ha disminuido cuando se emplea la metodología MIP-MSPD, lo que permite afirmar que se ha conseguido disminuir la

presencia de interferentes en el eluato final. Por todo ello, el empleo de esta metodología MIP-MSPD en muestras complejas está justificado.

De los tres procedimientos en los que se ha estudiado el proceso MSPD en este capítulo, se ha conseguido un mejor resultado en lo que se refiere a perfil cromatográfico y sencillez de procedimiento, cuando se ha utilizado la metodología MIP-MSPD, es por ello que esta es la metodología que ha sido validada en estudios posteriores, mediante el estudio de las características analíticas de la misma.

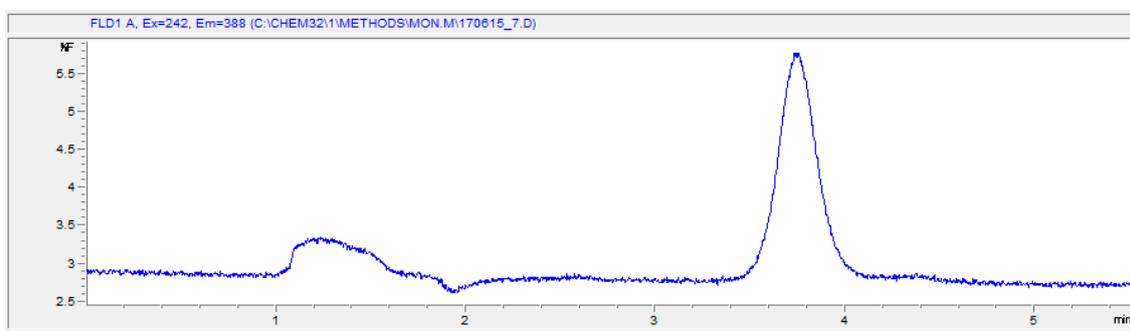


Figura 9.4. Cromatograma de 2 $\mu\text{g/L}$ de 1OHpyr en muestras de leche tras la MIP-MSPD

9.3.4. Validación del procedimiento MIP-MSPD en muestras de leche materna

El método MIP-MSPD desarrollado fue validado en términos de linealidad, precisión, recuperación, límites de de detección y cuantificación empleando muestras de leche dopadas con las correspondiente concentración de 1OHpyr para el procedimiento MIP-MSPD por dar resultados más selectivos.

La linealidad del método fue evaluada para el analito estudiado. Las curvas de calibración fueron construidas preparando muestras dopadas por triplicado conteniendo concentraciones crecientes de 1OHpyr. En el intervalo de 0,15 y 2,0 $\mu\text{g/L}$. Los resultados mostraron buena linealidad en ese intervalo con un coeficiente de correlación (R^2) mayores de 0,99. La recta de regresión se representa en la Figura 9.5.

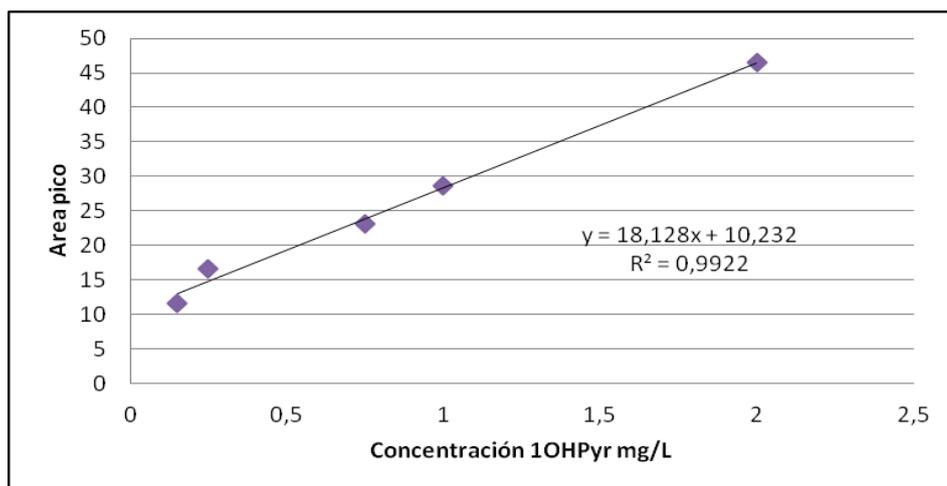


Figura 9.5. Recta de calibrado del 1OHPyr

Para evaluar la precisión y reproducibilidad intra e inter días para el procedimiento MSPD se realizaron diferentes ensayos a diferente concentración del analito.

La precisión se calculó en términos de reproducibilidad y repetibilidad determinada a tres niveles de concentración (0,15, 0,25 y 2,0 $\mu\text{g/L}$). Los resultados son los mostrados en la Tabla 9.1.

Con esta metodología se obtenía una recuperación del 91-99% siendo la RSD inferior al 8%. Estos datos muestran la buena repetitividad y exactitud del método.

Tabla 9.1. Valores de recuperación intra e inter días para MIP-MSPD

	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Precisión (%)	Recuperación (%) \pm SD
Reproducibilidad	0,15	5,2	91 \pm 5
	0,25	8,0	93 \pm 7
	2,00	4,0	93 \pm 4
Repetibilidad	0,15	6,8	93 \pm 6
	0,25	2,0	91 \pm 2
	2,00	2,8	99 \pm 2

Finalmente se calcularon los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ), de acuerdo con el mismo criterio que en el capítulo 5. Estos fueron respectivamente 0,056 y 0,189 µg/L. Estos límites muestran la idoneidad de emplear este método en la determinación de 1OHPyr en muestras de leche.

9.4. CONCLUSIONES

- La metodología propuesta en esta sección ha dado como resultado varios procedimientos de extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida. La MSPD, en sus diferentes estrategias, es una técnica simple y efectiva para la simultánea limpieza y extracción del analito en muestras complejas como la leche materna, con satisfactorios porcentajes de recuperación y límites de detección y de cuantificación, cubriendo las demandas en cuanto a desarrollo de los métodos requeridos en los estudios de biovigilancia.
- En el procedimiento MSPD en muestras de leche materna, aunque no específico, es sobre todo interesante para muestras con un elevado contenido graso como la leche. La leche materna es una matriz compleja que necesita una serie de pasos previos antes de poder ser analizada. El procedimiento propuesto no requiere desproteínizar, hidrolizar o cualquier método adicional de limpieza, por lo que el uso de la MSPD ofrece una alternativa sencilla, rápida, barata y eficaz, capaz de conseguir la limpieza y la extracción del 1OHPyr de la muestra en una sola etapa, necesitando, en este caso, sólo de un filtrado del extracto antes de ser introducido en el sistema de detección realizado con un HPCL-FD. Por otra parte, las condiciones de extracción son suaves, tanto de temperatura como de presión, no requiriendo equipos de vacío para el flujo de los extractos, ni gran cantidad de muestra o reactivos. Los resultados de

recuperación obtenidos para el 1OHPyr en las muestras de leche son eficaces, rondando el 91-99% en todos los ensayos realizados con una RSD inferior al 8%.

- Otro de los objetivos de esta investigación era la implementación del MIP como mejora del procedimiento MSPD convencional. Los artículos relacionados con el desarrollo de nuevos adsorbentes en MSPD son escasos, ofreciendo por tanto un área de oportunidad para incluir nuevos materiales para el tratamiento de muestras. La síntesis de nuevos materiales basados en MIP puede ayudar a diseñar soportes sólidos para MSPD con afinidad hacia un analito o grupo de analitos estructuralmente relacionados con la plantilla, de esta manera se pueden mejorar la selectividad de las extracciones favoreciendo las interacciones con el analito y eliminando las interferencias de la matriz.
- Se han investigado dos estrategias de incorporación del MIP al proceso MSPD. En el primer caso, se llevó a cabo el acoplamiento de un proceso MISPE al proceso MSPD, es decir, primeramente se llevó a cabo una extracción MSPD con el mismo procedimiento que en el caso descrito anteriormente y tras recoger el eluato obtenido en la MSPD, éste es incorporado a un cartucho MISPE formado por el polímero de impresión molecular, previamente acondicionado. Las recuperaciones obtenidas mediante esta metodología fueron muy inferiores a las obtenidas en el procedimiento de MSPD convencional, desestimándose esta vía de implementación del MIP a la MSPD.
- La segunda vía de incorporación de este material tan selectivo para el 1OHPyr a la MSPD consistió en la inclusión del polímero en el soporte sólido. El proceso dio buenas recuperaciones, así como extractos libres de interferentes, validándose dicho método para las muestras de leche materna, objetivo de esta parte experimental. Los resultados mostraron una gran efectividad, aportando una recuperación del 91 al 99 %

con una RSD < 8. Aunque los resultados son del mismo orden que los obtenidos tras realizar el proceso MSPD convencional, los cromatogramas de las Figuras 9.3 y 9.4, muestran como empleando el MIP como parte integrante del soporte sólido, se mejora la limpieza de la muestra, pudiéndose considerar un método adecuado cuando el analito se encuentre en presencia de otros interferentes.

- Por otra parte, y revisando la bibliografía actual, la investigación llevada a cabo en este capítulo de esta Tesis Doctoral presenta la primera aplicación de un MIP como parte integrante de un proceso MSPD (MIP-MSPD), para la determinación de hidroxilados de HAPs en muestras biológicas humanas, ofreciendo nuevas alternativas de tratamiento de muestra para los estudios de biovigilancia.

V. Conclusiones



V. CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral ha tenido como objetivo principal el desarrollo de nuevos procedimientos para la extracción, aislamiento y análisis del 1OHPyr en muestras biológicas humanas, como biomarcador representativo, sensible y fiable de la exposición a los HAPs. La presencia de 1OHPyr en orina guarda una correlación significativa entre sus niveles y el grado de exposición total a estos compuestos, por lo que puede emplearse como marcador en estudios de biovigilancia. Por otra parte, también esta exposición puede evaluarse en otras muestras biológicas como la leche materna.

En concordancia con los objetivos establecidos en esta Tesis y los resultados presentados, se exponen a continuación las conclusiones más significativas:

1. Se ha optimizado un método cromatográfico para HPLC-FD para el análisis de 1OHPyr y los interferentes estudiados. El método propuesto es sencillo y sensible con tiempos de análisis muy cortos, inferiores a 4 minutos.
2. Se han sintetizado con diferentes estrategias de polimerización varios polímeros de impresión molecular a través de una síntesis no covalente (en bloque y por precipitación).
3. Los polímeros sintetizados han sido caracterizados mediante estudios de adsorción y SEM.
 - 3.1. Los estudios de adsorción mostraron la especificidad de los polímeros impresos frente a los no impresos.
 - 3.2. Los dos polímeros (MIP_{precip} , MIP_{bloque}), se ajustan al modelo de las isothermas de Freundlich, con sitios de unión heterogéneos entre el polímero y el analito.
 - 3.3. La capacidad de adsorción resultó más alta en el MIP_{precip} , de acuerdo con la geometría del polímero y a las propias características derivadas de la síntesis por precipitación. El polímero sintetizado por precipitación presenta varias ventajas frente al polímero sintetizado en bloque. La más destacada es que ya no es

necesario manipular el polímero, evitando las etapas de trituración y tamizado, minimizando por tanto el contacto con la muestra. Esto conlleva menores pérdidas de material y la posible rotura de cavidades de reconocimiento formadas durante la polimerización. Por otro lado, esta mínima manipulación también es interesante para compuestos que presentan algún tipo de toxicidad, donde fuese adecuado reducir el contacto con los mismos, como podría ser el caso de los HAPs.

- 3.4. Las imágenes SEM muestran las diferencias morfológicas de los polímeros sintetizados por precipitación (pequeñas partículas esféricas, de un tamaño homogéneo) frente al sintetizado en bloque.
4. Se han desarrollado procedimientos de extracción empleando los diferentes MIP sintetizados (por precipitación y en bloque), como adsorbentes en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE), para la determinación selectiva de 1OHPyr en orina.
 - 4.1. El procedimiento de tratamiento de muestra y extracción selectiva propuesto ha rendido altas recuperaciones, con bajos límites de detección y cuantificación, buenos resultados de repetibilidad y reproducibilidad, con una gran especificidad hacia el analito de interés.
 - 4.2. La homogeneidad y estructura del polímero sintetizado por precipitación ha permitido mejorar sensiblemente las recuperaciones del 1OHPyr situándose éstas en un rango de 78-90 % con una RSD<6,7.
 - 4.3. En el polímero sintetizado en bloque las recuperaciones se mantuvieron en el intervalo del 71-83% con una RSD<8,8.
 - 4.4. La miniaturización del sistema ha permitido disminuir los volúmenes tanto de muestra como de disolventes. Los tiempos de análisis son cortos, permitiendo agilizar, por ejemplo, los análisis de rutina. Por otro lado, el rango de concentración en orina tanto de trabajadores expuestos como no expuestos

suele encontrarse entre 0,25-25 µg/L, por lo que el método propuesto puede ser destinado a estudios de biovigilancia.

4.5. Se ha demostrado que los MIP implementados en los procedimientos de extracción en fase sólida o MISPE son procedimientos rápidos, eficientes y selectivos, que han permitido la limpieza, preconcentración y aislamiento del 1OHPyr de la orina como matriz.

5. Se ha propuesto un sistema SPE-FIA para la preconcentración y extracción selectiva del 1OHPyr en muestras de orina empleando un MIP sintetizado en bloque como adsorbente incluido en una microcolumna integrada en el sistema.

5.1. El método propuesto ha permitido de una forma sencilla automatizar el análisis, mejorando los resultados analíticos.

5.2. El sistema FIA ha aportado además, la sencillez y rapidez de su procedimiento, minimizando la manipulación de la muestra y con unos resultados de recuperación del analito del 74-85%.

5.3. El procedimiento desarrollado ofrece buenas recuperaciones y la posibilidad de otras estrategias de acoplamiento. Por otra parte, este sistema podría ser fácilmente utilizado como método de cribado para evaluar la exposición ocupacional en algunos sectores.

6. Se han explorado diferentes procedimientos de dispersión de la matriz en fase sólida para la extracción de 1OHPyr en muestras de leche materna, destacando el procedimiento selectivo MIP-MSPD.

6.1. Las recuperaciones obtenidas utilizando MIP-MSPD fueron del orden de 91-99 con una RSD <8% en muestras de leche. El MIP aporta a este soporte sólido su capacidad de reconocimiento específico hacia el 1OHPyr.

- 6.2. Mediante la MIP-MSPD no fue necesario desproteinizar y desgrasar la leche, por lo que se simplificaban las operaciones de preparación de muestra, acortando el tiempo de análisis y el consumo de disolventes.
7. De forma general, se puede concluir que a lo largo de este trabajo se han desarrollado metodologías novedosas, sensibles y selectivas, para la evaluación de la exposición de los HAPs mediante el análisis de 1OHPyr en muestras biológicas, tanto de orina como de leche materna.
8. Hasta la actualidad, el número de publicaciones sobre MIP que centran sus estudios en el 1OHPyr es escaso, por lo que esta Tesis Doctoral brinda un nuevo enfoque para la determinación de los derivados hidroxilados de los HAPs proponiendo por primera vez la aplicación de los MIP en el tratamiento de muestra.
9. Las características analíticas de las distintas técnicas propuestas han permitido la determinación del 1OHPyr en el intervalo de concentraciones habituales en los estudios de biovigilancia en población general. Por lo tanto, todos los métodos de determinación de 1OHPyr propuestos pueden ser utilizados en la realización de dichos estudios de biovigilancia en laboratorios de rutina.
10. La investigación presentada en esta memoria abre la oportunidad de poner en funcionamiento la metodología desarrollada para otros compuestos análogos, como pueden ser los isómeros hidroxilados del fenantreno, también presentes en muestras biológicas en personas expuestas a los HAPs.



VI. Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Eljarrat, E.; Barcelo, D.: Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2003, 22, 655-665.
- [2] Boersma, C.; Allamandola, L. J.; Bauschlicher, C. W.; Ricca, A.; Cami, J.; Peeters, E.; de Armas, F. S.; Saborido, G. P.; Mattioda, A. L.; Hudgins, D. M.: The NASA ames PAH IR spectroscopic database and the FAR-IR. In *PAHs and the Universe: A symposium to celebrate the 25th Anniversary of the PAHs Hypothesis*; E D P Sciences 2011, 46, 109-115.
- [3] Harvey, R. G.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity*; Cambridge University Press, 1991.
- [4] Vives, I. G., J.O. ; Guitart, R: Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología* 2001, 3, 45-51.
- [5] Angerer, J.; Ewers, U.; Wilhelm, M.: Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2007, 210, 201-228.
- [6] USEPA: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 2008. Disponible en <http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>
- [7] Pott, P : Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet, Hawes, Clarke & Collins, 1775.
- [8] Koss, G.; Tesseraux, I. : En :*Toxicology*, Academic Press, 1999.
- [9] Yamagawa, K.; Ichikawa, K.: Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *Journal of Cancer Research*, 1918, 3, 1-29.
- [10] Bloch, B. ; Dreifuss, W.: Ueber die experimentelle erzeugung von carcino men mit Lymphdriisen und Lungenmetastasen durch Tierbestandteile. *Schewiz. Med. Wochenschr*, 1921, 51, 1033-1037.

- [11] Kennaway, E. L.: Experiments on cancer-producing substances. *British Medical Journal* 1925, 2, 1-4.
- [12] Cook, J.W; I. Hieger, I : The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. . *Journal of the Chemical Society*, 1933, 395-405.
- [13] UNEP: Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2001. Disponible en http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/convention_text/UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-FULL.English.PDF
- [14] IARC.: Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 2010, 92. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/>
- [15] Stellman, J. M.; McCann, M.: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (España), 1998. Disponible en <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/sumario.pdf>
- [16] Lauwerys, R. R.; Mercadal, J. A. M.; Garcés, M. M.: Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales; Masson, 1994.
- [17] Collin, G.; Höke, H.; Talbiersky, J.: Anthracene. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [18] Kay, G.G.; D.J. Mincher.; Turnbull, A.: Anthracene Derivatives as Anti-Cancer Agents. Google Patents, 2001.
- [19] Hawley, G. G.: *The condensed chemical dictionary*. Company, V. N. Reinold, 1987.
- [20] Windholz, M.: *The Merck index: an encyclopaedia of chemicals, drugs, and biologicals*; Merck, Rahway, 1983
- [21] Griesbaum, K.; Behr, A.; Biedenkapp, D.; Voges, H.-W.; Garbe, D.; Paetz, C.; Collin, G.; Mayer, D.; Höke, H.: Hydrocarbons. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.

- [22] Hawley, G. G.; Lewis, R. J.: Hawley's condensed chemical dictionary; V. N. Reinhold, 1993.
- [23] Wang, Y. G.; Zhu, B. C.; Xu, Q.; Zhu, Q.; Yu, L.: Synthesis of heterocycle-tethered acylbenzofurans and benzodifurans from odorless and recyclable organoseleno polystyrene resin. *Research Advances* 2014, 4, 49170-49179.
- [24] Li, X. H.; Cui, H. L.; Zhang, X. Z.: Theoretical investigation of a high density cage compound 1,3,5,7,9,11-hexanitrotetradecahydro-1H-1,3,4,5,7,7b,9,11,12a,12b[1],12b [2],13-dodecaaza-4,8,12-[epimethanetriyl]cyclohepta l cyclopenta def phenanthrene. *Structural Chemistry* 2013, 24, 1411-1417.
- [25] ATSDR: Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. 1995. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=122&tid=25>
- [26] Orden PRE/928/2012, de 3 de mayo, por la que se incluye la sustancia activa creosota, en el anexo I del Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. BOE 2012, 107.
- [27] Xie, J.; Cai, C.; Lai, S.; Yang, L.; Luo, L.; Yang, H.; Chen, Y.; Chen, X.: Synthesis and application of a MIP as a filter to reduce polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mainstream cigarette smoke. *Reactive and Functional Polymers* 2013, 73, 1606-1611.
- [28] Kazerouni, N.; Sinha, R.; Hsu, C. H.; Greenberg, A.; Rothman, N.: Analysis of 200 food items for benzo a pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39, 423-436.
- [29] Agudo, A.: Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos [HAP]. Acercamiento a su problemática como riesgo laboral, 2009. Disponible en http://portal.ugt.org/saludlaboral/publicaciones/manual_estudio/Hidrocarburos.pdf
- [30] Lijinsky, W.: The formation and occurrence of polynuclear aromatic-hydrocarbons associated with food. *Mutation Research* 1991, 259, 251-261.

- [31] García, M. M. J.: Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, análisis y remediación (Tesis Doctoral) Universidad Politécnica de Madrid, 2005.
- [32] Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Luduena, B.; Sanchez, H.; Alvarez, H.; Gutierrez, A.: Polyaromatic hydrocarbons. Health risk and biomarkers. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2005, 39, 27-36.
- [33] Jacob, R.; Seidel, A.: Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2002, 778, 31-47.
- [34] Shimada, T.; Hayes, C. L.; Yamazaki, H.; Amin, S.; Hecht, S. S.; Guengerich, F. P.; Sutter, T. R.: Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. Cancer Research 1996, 56, 2979-2984.
- [35] Seferian, A.: Química y su enseñanza: ¿Qué hay de nuevo ahora?; Dunken, 2015.
- [36] Díaz-Báez, M. C.; López, M. C. B.; Ramírez, A. J. E.: Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos; Ingeniería e Investigación 2009, 29, 142-142.
- [37] IPCS: WHO. International Programme on Chemical Safety Environmental Criteria 202. Selected Non Heterocyclic PAHs. 1998. Disponible en <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>
- [38] Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C.: Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination. Agronomy for Sustainable Development 2006, 26, 195-199.
- [39] Feidt, C.; Cavret, S.; Grova, N.; Laurent, C.; Rychen, G.: Evaluation of the risk of PAHs and dioxins transfer to humans via the dairy ruminant. Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems 2005, 419-430.
- [40] Rychen, G.; Ducoulombier-Crepineau, C.; Grova, N.; Jurjanz, S.; Feidt, C.: Terms and risk of transfer of persistent organic pollutants into milk. Productions Animales 2005, 18, 355-366.

- [41] Feidt, C.; Grova, N.; Crepineau, C.; Lutz, S.; Rychen, G.; Inra; Inra: Polycyclic aromatic hydrocarbons transfer in lactating ruminant - Methodological approach and preliminary results; *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, 2002,343-345
- [42] Grova, N.; Feidt, C.; Laurent, C.; Rychen, G.: C-14 Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of C-14 polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal* 2002, 12, 1025-1031.
- [43] Lapole, D.; Rychen, G.; Grova, N.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C.: Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. *Journal of Dairy Science* 2007, 90, 2624-2629.
- [44] Giessing, A. M. B.; Lund, T.: Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide in tissue of marine polychaete *Nereis diversicolor* by liquid chromatography/ion trap multiple mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002, 16, 1521-1525.
- [45] Shahtaheri, S. J.; Ibrahimi, L.; Golbabaie, F.; Hosseini, M.; Fouladi, B.: Optimization of sample preparation for 1-hydroxypyrene as a major biomarker of exposure to PAHs prior to HPLC. *Iranian Journal of Public Health* 2006, 35, 33-41.
- [46] Rey-Salgueiro, L.; Martinez-Carballo, E.; Garcia-Faicon, M. S.; Gonzalez-Barreiro, C.; Simal-Gandara, J.: Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. *Food Chemistry* 2009, 115, 814-819.
- [47] Chahin, A.; Guiavarc'h, Y. P.; Dziurla, M.-A.; Toussaint, H.; Feidt, C.; Rychen, G.: 1-hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 1780-1786.
- [48] Koch, R.: *The Handbook of Environmental Chemistry.*; O Hutzinger, 1982
- [49] Eiguren-Fernandez, A.; Avol, E. L.; Thurairatnam, S.; Hakami, M.; Froines, J. R.; Miguel, A. H.: Seasonal influence on vapor- and particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in school communities located in Southern California. *Aerosol Science and Technology* 2007, 41, 438-446.

- [50] Díaz G, O. R., Bernal C. : Predicción de la biodisponibilidad de pireno y fenantreno a través de su extractabilidad en butanol en suelos contaminados con diesel. *Terra Latinoamericana* 2010, 28, 203-210.
- [51] Van Lipzig, M. M. H.; Vermeulen, N. P. E.; Gusinu, R.; Legler, J.; Frank, H.; Seidel, A.; Meerman, J. H. N.: Formation of estrogenic metabolites of benzo a pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005, 19, 41-55.
- [52] Gozgit, J. M.; Nestor, K. M.; Fasco, M. J.; Pentecost, B. T.; Arcaro, K. F.: Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004, 196, 58-67.
- [53] Guiavarc'h, Y. P.; Chahin, A.; Dziurla, M. A.; Toussaint, H.; Feidt, C.; Rychen, G.: Evaluation of small dairy ruminant exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A biomarker approach. *Small Ruminant Research* 2010, 91, 141-152.
- [54] Llop, S.; Ballester, F.; Estarlich, M.; Ibarluzea, J.; Manrique, A.; Rebagliato, M.; Esplugues, A.; Iniguez, C.: Urinary 1-hydroxypyrene, air pollution exposure and associated life style factors in pregnant women. *The Science of the total environment* 2008, 407, 97-104.
- [55] Albers, P.H.: *Handbook of Ecotoxicology*; Lewis Publishers, 1995.
- [56] Netto, D. P.: *Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Amostras Ambientais. (Tesis Doctoral) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.*
- [57] De Fatima Costa, A.: *Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromaticos (PAHS): 1-Hidroxipireno urinário. (Tesis Doctoral) Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro, 2001.*
- [58] Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J.: *Handbook of Ecotoxicology*; Lewis Publishers, 2002.

- [59] Sims, R. C.; Overcash, M. R.: Fate of polynuclear aromatic-compounds [PNAS] in soil-plant systems. *Residue Reviews* 1983, 88, 1-68.
- [60] Wilson, S. C.; Jones, K. C.: Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic-hydrocarbons [PAHS] - A Review. *Environmental pollution* 1993, 81, 229-249.
- [61] Juhasz, A. L.; Naidu, R.: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo a pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2000, 45, 57-88.
- [62] Shaw, G. R.; Connell, D. W.: Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic-compounds [PACS]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1994, 135, 1-62.
- [63] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.: *Fundamentos de química analítica*; Reverté, 1996.
- [64] Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US, 2007.
- [65] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Gómez, M. C. M.: *Principios de análisis instrumental*; McGraw-Hill, 2001.
- [66] Beyer, J.; Jonsson, G.; Porte, C.; Krahn, M. M.; Ariese, F.: Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon [PAH] pollutants in fish bile: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2010, 30, 224-244.
- [67] Winnik, F. M.: Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. *Chemical Reviews* 1993, 93, 587-614.
- [68] Needham, L. L.; Calafat, A. M.; Barr, D. B.: Uses and issues of biomonitoring. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2007, 210, 229-238.
- [69] Barr, D. B.; Wang, R. Y.; Needham, L. L.: Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: Requirements and issues for consideration for the National Children's Study. *Environmental Health Perspectives* 2005, 113, 1083-1091.

- [70] Roca Marugan, M.; Yusà Pelechà, V.: Biomonitorización Humana de contaminantes ambientales. *Nemus Publicació anual de l'Ateneu de Natura* 2013, 3, 59-69.
- [71] Esteban, M.; Castano, A.: Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environment International* 2009, 35, 438-449.
- [72] Kehoe, R. A.; Thamann, F.: The behavior of lead in the animal organism III Colloidal lead compounds. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1933, 19, 178-194.
- [73] Schrenk, H. H.; Yant, W. P.; Sayers, R. R.: A new procedure for the control of benzene exposure. *Journal of the American Medical Association* 1936, 107, 849-852.
- [74] Yusa, V.; Ye, X. Y.; Calafat, A. M.: Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2012, 38, 129-142.
- [75] Onyemauwa, F.; Rappaport, S. M.; Sobus, J. R.; Gajdosova, D.; Wu, R. a.; Waidyanatha, S.: Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify mono hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009, 877, 1117-1125.
- [76] Farré, M.; Barceló, D.; Barceló, D.: Analysis of emerging contaminants in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 43, 240-253.
- [77] Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.: Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 801, 141-156.
- [78] Farré, M.; Pérez, S.; Gonçalves, C.; Alpendurada, M. F.; Barceló, D.: Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2010, 29, 1347-1362.

- [79] Tobiszewski, M.; Mechlińska, A.; Zygmunt, B.; Namieśnik, J.: Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2009, 28, 943-951.
- [80] Jongeneelen, F. J.: Benchmark Guideline for Urinary 1-Hydroxypyrene as Biomarker of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Ann. occup. Hyg.* 2001, 45, 3-13.
- [81] CDC: Centers for Disease Control and Prevention. National Biomonitoring Program. 2008. Disponible en <http://www.cdc.gov/exposurereport/>
- [82] NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey. 1999-2000. Disponible en
- [83] HESI: Health and Environmental Science Institute 2004. Disponible en http://wwwn.cdc.gov/nchs/nhanes/search/nhanes99_00.aspx
- [84] Schulz, C.; Angerer, J.; Ewers, U.; Kolossa-Gehring, M.: The German Human Biomonitoring Commission. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2007, 210, 373-382.
- [85] C. Sweatte, R. S., P. Ruel, M. Wuennenberg, K. Tarr, A. la Cour-Harbo, B. Feldberg, J. Kivinen, H. Hólm, M. Raustein, E. Jangren, B. Mulac, J. Adler, D. Davis, L. Cary, S. Lesenkov: Implementing Scientific Data Collection across the Arctic Oceanic Region Utilizing Unmanned Aircraft Systems [UAS]. *Arctic Monitoring and Assessment Programme*, 2015. Disponible en <http://www.amap.no/documents>
- [86] Haines, D. A.; Murray, J.: Human biomonitoring of environmental chemicals-Early results of the 2007-2009 Canadian Health Measures Survey for males and females. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2012, 215, 133-137.
- [87] Canas, A. I.; Cervantes-Amat, M.; Esteban, M.; Ruiz-Moraga, M.; Perez-Gomez, B.; Mayor, J.; Castano, A.: Blood lead levels in a representative sample of the Spanish adult population: the BIOAMBIENT.ES project. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2014, 217, 452-9.

- [88] Perez-Gomez, B.; Pastor-Barriuso, R.; Cervantes-Amat, M.; Esteban, M.; Ruiz-Moraga, M.; Aragonés, N.; Pollán, M.; Navarro, C.; Calvo, E.; Roman, J.; Lopez-Abente, G.; Castano, A.: BIOAMBIENT.ES study protocol: rationale and design of a cross-sectional human biomonitoring survey in Spain. *Environmental Science and Pollution Research International* 2013, 20, 1193-2002.
- [89] Judy Choi, T. A.; e, M.; rck, A. J. L. E. K.: Major national human biomonitoring programs in chemical exposure assessment. *AIMS Environmental Science* 2015, 2, 782-802.
- [90] Bartolome, M.; Ramos, J. J.; Cutanda, F.; Huetos, O.; Esteban, M.; Ruiz-Moraga, M.; Calvo, E.; Perez-Gomez, B.; Gonzalez, O.; Castano, A.; Es, B.: Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENT.ES project. *Chemosphere* 2015, 135, 436-446.
- [91] PNA: Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y Reglamento 850/2004 sobre COP. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/pnestocolmofinal_31enero2007_tcm7-3187.pdf
- [92] Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de Diciembre de 2004 relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente. *Official Journal of the European Union* 2005, 23, 3-16.
- [93] Disposición 1645 relativa a la mejora de la calidad de aire, BOE 2011, 25.
- [94] Directiva 215/4/CE que modifica el Reglamento (CE) 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. *Official Journal of the European Union* 2011, 215.
- [95] Montes, N. U.; MT; Eguiarte, I: Metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en orina: Estudio comparativo de dos métodos cromatográficos para el análisis del 1-hidroxipireno. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo [INSHT] 2001.
- [96] Directiva 1272/2013 por la que se modifica, con relación a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, el anexo XVII del Reglamento (CE) n ° 1907/2006 del Parlamento

Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas. Official Journal of the European Union, 2013, 328.

[97] PRTR ESPAÑA. Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. Disponible en: <http://www.prtr-es.es/>

[98] Piñero, S.; Rivero, E.; González, S.; Marrero, S.; Romero, G.; Arvelález, L.: Niveles urinarios de 1-Hidroxipireno en trabajadores expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos en la Industria de la Goma. Salud de los Trabajadores 2013, 21, 141-149.

[99] Jongeneelen, F. J.: Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people. Toxicology Letters 1994, 72, 205-211.

[100] Mercadocalderon, F.: Evaluation of 1-hydroxypyrene as bioindicator of industrial-exposure to polycyclic aromatic-hydrocarbons. Salud Publica de Mexico 1993, 35, 607-613.

[101] Lee, C. K.; Cho, S. H.; Kang, J. W.; Lee, S. J.; Ju, Y. S.; Sung, J. H.; Strickland, P. T.; Kang, D. H.: Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicology Letters 1999, 108, 209-215.

[102] Siwinska, E.; Mielzynska, D.; Smolik, E.; Bubak, A.; Kwapulinski, J.: Evaluation of intra- and interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Science of the Total Environment 1998, 217, 175-183.

[103] Levin, J. O.: First international workshop on [1-OHP] as a biomarker for PAH exposure in man. Summary and conclusions. Science of the Total Environment 1995, 163, 165-168.

[104] Hansen, A. M.; Mathiesen, L.; Pedersen, M.; Knudsen, L. E.: Urinary 1-hydroxypyrene [1-OHP] in environmental and occupational studies--a review. International Journal of Hygiene and Environmental Health 2008, 211, 471-503.

- [105] Freire, C.; Abril, A.; Fernandez, M. F.; Ramos, R.; Estarlich, M.; Manrique, A.; Aguirre, A.; Ibarluzea, J.; Olea, N.: Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in 4-year-old Spanish children. *The Science of the Total Environment* 2009, 407, 1562-9.
- [106] Huang, W.; Caudill, S. P.; Grainger, J.; Needham, L. L.; Patterson Jr, D. G.: Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: A study based on U.S. reference range values. *Toxicology Letters* 2006, 163, 10-19.
- [107] Chetiyankornkul, T.; Toriba, A.; Kizu, R.; Makino, T.; Nakazawa, H.; Hayakawa, K.: Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a deuterated internal standard. *Journal of Chromatography A* 2002, 961, 107-112.
- [108] Jongeneelen, F. J.; Anzion, R. B. M.; Henderson, P. T.: Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic-hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1987, 413, 227-232.
- [109] Hecht, S. S.: Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis* 2002, 23, 907-922.
- [110] Ibanez, R.; Agudo, A.; Berenguer, A.; Jakszyn, P.; Tormo, M. J.; Sanchez, M. J.; Quiros, J. R.; Pera, G.; Navarro, C.; Martinez, C.; Larranaga, N.; Dorronsoro, M.; Chirlaque, M. D.; Barricarte, A.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; Gonzalez, C. A.: Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Spanish population. *Journal of Food Protection* 2005, 68, 2190-2195.
- [111] Martorell, I.; Perello, G.; Marti-Cid, R.; Castell, V.; Llobet, J. M.; Domingo, J. L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons [PAH] in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International* 2010, 36, 424-432.
- [112] Tsai, P. J.; Shih, T. S.; Chen, H. L.; Lee, W. J.; Lai, C. H.; Liou, S. H.: Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator for assessing the exposures of booth attendants of a highway toll station to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* 2004, 38, 56-61.

-
- [113] American Conference of Industrial Hygienist-ACGIH, 2003, Disponible en <http://www.acgih.org/>
- [114] Jongeneelen, F.: Guidelines for biological monitoring of workers in aluminium production facilities for urinary 1-hydroxypyrene [1-pyrenol]. *Journal of Environmental Monitoring* 2004, 6, 61-65.
- [115] Annual Report; German Federal Environmental Agency, 2005. Disponible en <http://www.umweltbundesamt.de/en/publikationen/annual-report-2005-federal-environmental-agency>
- [116] Barr, D. B.; Wilder, L. C.; Caudill, S. P.; Gonzalez, A. J.; Needham, L. L.; Pirkle, J. L.: Urinary creatinine concentrations in the US population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environmental Health Perspectives* 2005, 113, 192-200.
- [117] Gmeiner, G.; Gärtner, P.; Krassnig, C.; Tausch, H.: Identification of various urinary metabolites of fluorene using derivatization solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography B* 2002, 766, 209-218.
- [118] Fan, R. F.; Ramage, R.; Wang, D. L.; Zhou, J. Q.; She, J. W.: Determination of ten monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid-liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta* 2012, 93, 383-391.
- [119] Jacob, J.; Grimmer, G.; Dettbarn, G.: Profile of urinary phenanthrene metabolites in smokers and non-smokers. *Biomarkers* 1999, 4, 319-327.
- [120] Chetiyakornkul, T.; Toriba, A.; Kameda, T.; Tang, N.; Hayakawa, K.: Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, 386, 712-718.
- [121] Gundel, J.; Schaller, K. H.; Angerer, J.: Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 4-hydroxybenz[a]anthracene and 3-

hydroxybenzo[a]pyrene. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2000, 73, 270-274.

[122] Grimmer, G.; Dettbarn, G.; Jacob, J.: Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites (phenols and dihydrodiols). *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1993, 65, 189-199.

[123] Mannschreck, C.; Gundel, J.; Angerer, J.: Occupational exposure to PAHS - Biological monitoring of hydroxylated metabolites. *Polycyclic Aromatic Compounds* 1996, 11, 11-18.

[124] Smith, C. J.; Huang, W. L.; Walcott, C. J.; Turner, W.; Grainger, J.; Patterson, D. G.: Quantification of monohydroxy-PAH metabolites in urine by solid-phase extraction with isotope dilution-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 372, 216-220.

[125] Lintelmann, J.: MAK-Collection for Occupational Health and Safety; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002

[126] Barbeau, D.; Marques, M.; Maitre, A.: 3-hydroxybenzo a pyrene as a new biomarker of exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology Letters* 2009, 189, 160-160.

[127] Jongeneelen, F. J.; Leijdekkers, C.-M.; Henderson, P. T.: Urinary excretion of 3-hydroxybenzo[a]pyrene after percutaneous penetration and oral absorption of benzo[a]pyrene in rats. *Cancer Letters* 1984, 25, 195-201.

[128] Gundel, J.; Angerer, J.: High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo a pyrene and 3-hydroxybenz a anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *Journal of Chromatography B* 2000, 738, 47-55.

[129] Bouchard, M.; Dodd, C.; Viau, C.: Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine. *Journal of Analytical Toxicology* 1994, 18, 261-264.

- [130] Ariese, F.; Verkaik, M.; Hoornweg, G. P.; Vandenesse, R. J.; Ukemaleenstra, S. R.; Hofstraat, J. W.; Gooijer, C.; Velthorst, N. H.: Trace analysis of 3-Hydroxy benzo [a] pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic-hydrocarbons. *Journal of Analytical Toxicology* 1994, 18, 195-204.
- [131] Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Muller, R.; Mosbach, K.: Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* 1993, 361, 645-647.
- [132] Wulff, G.; Sarhan, A.: Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. *Angewandte Chemie-International Edition* 1972, 11, 341-344.
- [133] Huang, Z.; Lee, H. K.: Materials-based approaches to minimizing solvent usage in analytical sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2012, 39, 228-244.
- [134] Mehdinia, A.; Aziz-Zanjani, M. O.: Advances for sensitive, rapid and selective extraction in different configurations of solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 51, 13-22.
- [135] Martín-Esteban, A.: Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 45, 169-181.
- [136] Lian, Z. R.; Wang, J. T.: Study of molecularly imprinted solid-phase extraction of gonyautoxins 2,3 in the cultured dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Environmental pollution* 2013, 182, 385-91.
- [137] Hu, Y.; Pan, J.; Zhang, K.; Lian, H.; Li, G.: Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 43, 37-52.
- [138] Ye, L.; Mosbach, K.; Spivak, D.A. ; Sibrian-Vazquez, M.: Molecularly imprinted materials: Towards the next generation. *MRS Proceedings*, 2002, 723, M.3.1.
- [139] Piletsky, S. A.; Alcock, S.; Turner, A. P. F.: Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. *Trends in Biotechnology* 2001, 19, 9-12.

- [140] Piletsky, S. A.; Panasyuk, T. L.; Piletskaya, E. V.; Nicholls, I. A.; Ulbricht, M.: Receptor and transport properties of imprinted polymer membranes - a review. *Journal of Membrane Science* 1999, 157, 263-278.
- [141] Piletsky, S. A.; Piletskaya, E. V.; Sergeyeva, T. A.; Panasyuk, T. L.; El'skaya, A. V.: Molecularly imprinted self-assembled films with specificity to cholesterol. *Sensors and Actuators B-Chemical* 1999, 60, 216-220.
- [142] He, C.; Long, Y.; Pan, J.; Li, K.; Liu, F.: Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2007, 70, 133-50.
- [143] Wang, S.; Zhang, R. F.: Selective solid-phase extraction of trace copper ions in aqueous solution with a Cu[II]-imprinted interpenetrating polymer network gel prepared by ionic imprinted polymer [IIP] technique. *Microchimica Acta* 2006, 154, 73-80.
- [144] Pichon, V.; Haupt, K.: Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2006, 29, 989-1023.
- [145] Haupt, K.; Mosbach, K.: Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews* 2000, 100, 2495-2504.
- [146] Hillberg, A. L.; Brain, K. R.; Allender, C. J.: Molecular imprinted polymer sensors: implications for therapeutics. *Advanced drug delivery reviews* 2005, 57, 1875-89.
- [147] Wulff, G.: Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews* 2002, 102, 1-27.
- [148] Turiel, E.; Martin-Esteban, A.: Molecular imprinting technology in capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science* 2005, 28, 719-728.
- [149] Hogendoorn, E.; van Zoonen, P.: Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *Journal of Chromatography A* 2000, 892, 435-453.

-
- [150] Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N.: Imprinted polymers. *Advanced Materials* 2001, 13, 467-&.
- [151] Fernández-González, A.; Guardia, L.: Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* 2007, 2, 14-22.
- [152] Sellergren, B.: *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*; Elsevier Science, 2000.
- [153] Nicholls, I. A.; Adbo, K.; Andersson, H. S.; Andersson, P. O.; Ankarloo, J.; Hedin-Dahlstrom, J.; Jokela, P.; Karlsson, J. G.; Olofsson, L.; Rosengren, J.; Shoravi, S.; Svenson, J.; Wikman, S.: Can we rationally design molecularly imprinted polymers? *Analytica Chimica Acta* 2001, 435, 9-18.
- [154] Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z.: Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 804, 173-182.
- [155] Glad, M.; Reinholdsson, P.; Mosbach, K.: Molecularly imprinted composite polymers based on trimethylolpropane trimethacrylate [TRIM] Particles for efficient enantiomeric separations. *Reactive Polymers* 1995, 25, 47-54.
- [156] Lanza, F.; Hall, A. J.; Sellergren, B.; Bereczki, A.; Horvai, G.; Bayoudh, S.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.: Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Analytica Chimica Acta* 2001, 435, 91-106.
- [157] Mayes, A. G.; Whitcombe, M. J.: Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced drug delivery reviews* 2005, 57, 1742-1778.
- [158] Wulff, G.; Vesper, W.; Grobeeinsler, R.; Sarhan, A.: Enzyme-analogue built polymers, .4. synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for resolution of racemates. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* 1977, 178, 2799-2816.

- [159] Opik, A.; Menaker, A.; Reut, J.; Syritski, V.: Molecularly imprinted polymers: a new approach to the preparation of functional materials. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 2009, 58, 3-11.
- [160] Sellergren, B.; Andersson, L.: Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate-analog imprinting strategy. *Journal of Organic Chemistry* 1990, 55, 3381-3383.
- [161] Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N.: A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *Journal of the American Chemical Society* 1995, 117, 7105-7111.
- [162] Arshady, R.: Synthesis of para-bromostyrene from para-dibromobenzene. *Chemistry & Industry* 1981, 7, 250-251.
- [163] Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J.: Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition* 2006, 19, 106-180.
- [164] Barranco, A. A.; N. Balirio, J.: ELIKAMIP-Desarrollo de polímeros de impresión molecular [MIP] para la detección y eliminación de contaminantes químicos en alimentos líquidos. Proyecto AZTI Tecnalia, 2008. Disponible en:
<http://www.triptolemos.org/catalogo/proyecto/elikamip-desarrollo-de-pol%C3%ADmeros-de-impresi%C3%B3n-molecular-mip-para-la-detecci%C3%B3n-y-eliminaci%C3%B3n>
- [165] Sellergren, B.: Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 1999, 18, 164-174.
- [166] Haupt, K.: Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst* 2001, 126, 747-756.

-
- [167] Whitcombe, M. J.; Martin, L.; Vulfson, E. N.: Predicting the selectivity of imprinted polymers. *Chromatographia* 1998, 47, 457-464.
- [168] Ramstrom, O.; Andersson, L. I.; Mosbach, K.: Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. *Journal of Organic Chemistry* 1993, 58, 7562-7564.
- [169] Sallacan, N.; Zayats, M.; Bourenko, T.; Kharitonov, A. B.; Willner, I.: Imprinting of nucleotide and monosaccharide recognition sites in acrylamidephenylboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers. *Analytical Chemistry* 2002, 74, 702-712.
- [170] Yu, C.; Mosbach, K.: Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group. *Journal of Molecular Recognition* 1998, 11, 69-74.
- [171] Liu, Z. S.; Xu, Y. L.; Yan, C.; Gao, R. Y.: Mechanism of molecular recognition on molecular imprinted monolith by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 2005, 1087, 20-28.
- [172] Sibrian-Vazquez, M.; Spivak, D. A.: Molecular Imprinting Made Easy. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 7827-7833.
- [173] Mosbach, K.; Ramstrom, O.: The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio-Technology* 1996, 14, 163-170.
- [174] Wulff, G.: Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - A way towards artificial antibodies. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1995, 34, 1812-1832.
- [175] Fernández, R.: Desarrollo de un polímero de impronta molecular para la determinación de metilmercurio en productos pesqueros. (Trabajo de Fin de Máster) Universidad de Santiago de Compostela, 2013.

- [176] Mosbach, K.: Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding, of compounds with biological activity [biomimetics]. *Analytica Chimica Acta* 2001, 435, 3-8.
- [177] Song, S. Q.; Wu, A. B.; Shi, X. Z.; Li, R. X.; Lin, Z. X.; Zhang, D. B.: Development and application of molecularly imprinted polymers as solid-phase sorbents for erythromycin extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 390, 2141-2150.
- [178] Guzzella, L.; Pozzoni, F.; Baggiani, C.: Synthesis and characterization of a propazine imprinted polymer for the extraction of triazines herbicides. *Water Science and Technology* 2008, 57, 139-144.
- [179] Krupadam, R. J.; Bhagat, B.; Wate, S. R.; Bodhe, G. L.; Sellergren, B.; Anjaneyulu, Y.: Fluorescence Spectrophotometer Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Samples Based on Solid Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymer. *Environmental Science & Technology* 2009, 43, 2871-2877.
- [180] Ye, L.; Mosbach, K.: Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. *Reactive & Functional Polymers* 2001, 48, 149-157.
- [181] Ye, L.; Cormack, P. A. G.; Mosbach, K.: Molecular imprinting on microgel spheres. *Analytica Chimica Acta* 2001, 435, 187-196.
- [182] Wei, S. T.; Mizaikoff, B.: Binding site characteristics of 17 beta-estradiol imprinted polymers. *Biosensors & bioelectronics* 2007, 23, 201-209.
- [183] Haupt, K.; Dzgoev, A.; Mosbach, K.: Assay system for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial recognition element. *Analytical Chemistry* 1998, 70, 628-631.
- [184] de Boer, T.; Mol, R.; de Zeeuw, R. A.; de Jong, G. J.; Sherrington, D. C.; Cormack, P. A. G.; Ensing, K.: Spherical molecularly imprinted polymer particles: A promising tool for molecular recognition in capillary electrokinetic separations. *Electrophoresis* 2002, 23, 1296-1300.

-
- [185] Daniel, S.; Prabhakara Rao, P.; Prasada Rao, T.: Investigation of different polymerization methods on the analytical performance of palladium(II) ion imprinted polymer materials. *Analytica Chimica Acta* 2005, 536, 197-206.
- [186] Guerrero-Sanchez, C.; Erdmenger, T.; Šereda, P.; Wouters, D.; Schubert, U. S.: Water-Soluble Ionic Liquids as Novel Stabilizers in Suspension Polymerization Reactions: Engineering Polymer Beads. *Chemistry – A European Journal* 2006, 12, 9036-9045.
- [187] Ansell, R. J.; Mosbach, K.: Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent. *Journal of Chromatography A* 1997, 787, 55-66.
- [188] Hosoya, K.; Yoshizako, K.; Tanaka, N.; Kimata, K.; Araki, T.; Haginaka, J.: Uniform-size macroporous polymer-based stationary-phase for hplc prepared through molecular imprinting technique. *Chemistry Letters* 1994, 1437-1438.
- [189] Shamsipur, M.; Fasihi, J.; Ashtari, K.: Grafting of ion-imprinted polymers on the surface of silica gel particles through covalently surface-bound initiators: A selective sorbent for uranyl ion. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 7116-7123.
- [190] Tokuyama, H.; Naohara, S.; Fujioka, M.; Sakohara, S.: Preparation of molecular imprinted thermosensitive gels grafted onto polypropylene by plasma-initiated graft polymerization. *Reactive & Functional Polymers* 2008, 68, 182-188.
- [191] Guo, T. Y.; Xia, Y. Q.; Hao, G. J.; Zhang, B. H.; Fu, G. Q.; Yuan, Z.; He, B. L.; Kennedy, J. F.: Chemically modified chitosan beads as matrices for adsorptive separation of proteins by molecularly imprinted polymer. *Carbohydrate Polymers* 2005, 62, 214-221.
- [192] Fernandez-Gonzalez, A.; Guardia, L.; Badia-Laino, R.; Diaz-Garcia, M. E.: Mimicking molecular receptors for antibiotics - analytical implications. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2006, 25, 949-957.

- [193] Sanchez-Barragan, I.; Karim, K.; Costa-Fernandez, J. M.; Piletsky, S. A.; Sanz-Medel, A.: A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2007, 123, 798-804.
- [194] Sellergren, B.: Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2001, 906, 227-252.
- [195] Quaglia, M.; Sellergren, B.; De Lorenzi, E.: Approaches to imprinted stationary phases for affinity capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 2004, 1044, 53-66.
- [196] Marx, S.; Zaltsman, A.; Turyan, I.; Mandler, D.: Parathion sensor based on molecularly imprinted sol-gel films. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 120-126.
- [197] Song, S.; Shi, X.; Li, R.; Lin, Z.; Wu, A.; Zhang, D.: Extraction of chlorpromazine with a new molecularly imprinted polymer from pig urine. *Process Biochemistry* 2008, 43, 1209-1214.
- [198] Caro, E.; Marce, R.; Borrull, F.; Cormack, P.; Sherrington, D.: Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2006, 25, 143-154.
- [199] Stevenson, D.: Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 1999, 18, 154-158.
- [200] Ariffin, M. M.; Miller, E. I.; Cormack, P. A. G.; Anderson, R. A.: Molecularly imprinted solid-phase extraction of diazepam and its metabolites from hair samples. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 256-262.
- [201] Thibert, V.; Legeay, P.; Chapuis-Hugon, F.; Pichon, V.: Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis. *Talanta* 2012, 88, 412-419.
- [202] Muhammad, T.; Cui, L.; Wang, J. D.; Piletska, E. V.; Guerreiro, A. R.; Piletsky, S. A.: Rational design and synthesis of water-compatible molecularly imprinted polymers for selective solid phase extraction of amiodarone. *Analytica Chimica Acta* 2012, 709, 98-104.

- [203] Sellergren, B.: Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. *Analytical Chemistry* 1994, 66, 1578-1582.
- [204] Caro, E.; Masque, M.; Marce, R. M.; Borrull, F.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.: Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples. *Journal of Chromatography A* 2002, 963, 169-178.
- [205] Lucci, P.; Derrien, D.; Alix, F.; Perollier, C.; Bayouhd, S.: Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts. *Analytica Chimica Acta* 2010, 672, 15-19.
- [206] Masque, N.; Marce, R. M.; Borrull, F.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.: Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from environmental water. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 4122-4126.
- [207] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.: Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 1990, 62, 2145-2148.
- [208] Mullett, W. M.; Martin, P.; Pawliszyn, J.: In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. *Analytical Chemistry* 2001, 73, 2383-2389.
- [209] Zhu, X. L.; Cai, J. B.; Yang, J.; Su, Q. D.; Gao, Y.: Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. *Journal of Chromatography A* 2006, 1131, 37-44.
- [210] Zhang, Y.; Liu, R. J.; Hu, Y. L.; Li, G.: Microwave Heating in Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Beads for Trace Triazines Analysis in Complicated Samples. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 967-976.
- [211] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Foglia, P.; Samperi, R.; Stampachiacciere, S.; Ventura, S.; Laganà, A.: Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2015, 71, 186-193.

- [212] Yan, H. Y.; Qiao, F. X.; Row, K. H.: Molecularly imprinted-matrix solid-phase dispersion for selective extraction of five fluoroquinolones in eggs and tissue. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 8242-8248.
- [213] Sun, H. W.; Qiao, F. X.; Liu, G. Y.; Liang, S. X.: Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *Analytica Chimica Acta* 2008, 625, 154-159.
- [214] Nemulenzi, O.; Mhaka, B.; Cukrowska, E.; Ramstrom, O.; Tutu, H.; Chimuka, L.: Potential of combining of liquid membranes and molecularly imprinted polymers in extraction of 17 beta-estradiol from aqueous samples. *Journal of Separation Science* 2009, 32, 1941-1948.
- [215] Hirayama, K.; Sakai, Y.; Kameoka, K.: Synthesis of polymer particles with specific lysozyme recognition sites by a molecular imprinting technique. *Journal of Applied Polymer Science* 2001, 81, 3378-3387.
- [216] Fazal, F. M.; Hansen, D. E.: Glucose-specific poly[allylamine] hydrogels- A reassessment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007, 17, 235-238.
- [217] Suedee, R.; Seechamnaturakit, V.; Canyuk, B.; Ovatiarnporn, C.; Martin, G. P.: Temperature sensitive dopamine-imprinted [N,N-methylene-bis-acrylamide cross-linked] polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine. *Journal of Chromatography A* 2006, 1114, 239-249.
- [218] Hantash, J.; Bartlett, A.; Oldfield, P.; Denes, G.; O'Rielly, R.; Roudiere, D.; Menduni, S.: Use of an on-line imprinted polymer pre-column, for the liquid chromatographic-UV absorbance determination of carbaryl and its metabolite in complex matrices. *Journal of Chromatography A* 2006, 1125, 104-111.
- [219] Li, X.; Husson, S. M.: Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: A surface plasmon resonance study. *Biosensors & bioelectronics* 2006, 22, 336-348.

- [220] Aboul-Enein, H. Y.; Stefan, R. I.: Enantioselective sensors and biosensors in the analysis of chiral drugs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 1998, 28, 259-266.
- [221] Maloney, T. D.; Colon, L. A.: Comparison of column packing techniques for capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science* 2002, 25, 1215-1225.
- [222] Liu, Z.; Zou, H. F.; Ye, M. L.; Ni, J. Y.; Zhang, Y. K.: Effects of organic modifiers on retention mechanism and selectivity in micellar electrokinetic capillary chromatography studied by linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A* 1999, 863, 69-79.
- [223] Huang, X.; Zhang, J.; Horvath, C.: Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous layer open-tubular columns. *Journal of Chromatography A* 1999, 858, 91-101.
- [224] Liu, Z. S.; Zheng, C.; Yan, C.; Ga, R. Y.: Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC. *Electrophoresis* 2007, 28, 127-136.
- [225] Liu, C. Y.; Lin, C. C.: An insight into molecularly imprinted polymers for capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 2004, 25, 3997-4007.
- [226] Wistuba, D.; Schurig, V.: Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, 875, 255-276.
- [227] Lakshmi, D.; Prasad, B. B.; Sharma, P. S.: Creatinine sensor based on a molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode. *Talanta* 2006, 70, 272-280.
- [228] Dickert, F. L.; Achatz, P.; Halikias, K.: Double molecular imprinting - a new sensor concept for improving selectivity in the of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2001, 371, 11-15.
- [229] Dickert, F. L.; Lieberzeit, P.; Tortschanoff, M.: Molecular imprints as artificial antibodies - a new generation of chemical sensors. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2000, 65, 186-189.

- [230] Dickert, F. L.; Tortschanoff, M.; Bulst, W. E.; Fischerauer, G.: Molecularly Imprinted Sensor Layers for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 4559-4563.
- [231] Lieberzeit, P. A.; Halikias, K.; Afzal, A.; Dickert, F. L.: Polymers imprinted with PAH mixtures-comparing fluorescence and QCM sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 392, 1405-1410.
- [232] Lai, J.-P.; Niessner, R.; Knopp, D.: Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples. *Analytica Chimica Acta* 2004, 522, 137-144.
- [233] Baggiani, C.; Anfossi, L.; Baravalle, P.; Giovannoli, C.; Giraudi, G.: Molecular recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons by pyrene-imprinted microspheres. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 389, 413-422.
- [234] Nicole, K.; John, P. H.; David, J. B.; Richard, W. L.; David, V. M.: Towards the development of molecularly imprinted polymer based screen-printed sensors for metabolites of PAHs. *Analyst* 2001, 126, 1936-1941.
- [235] Baltrons, O.; Lopez-Mesas, M.; Palet, C.; Le Derf, F.; Portet-Koltalo, F.: Molecularly imprinted polymer-liquid chromatography/fluorescence for the selective clean-up of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Analytical Methods*. 2013, 5, 6297-6305.
- [236] Kabir, A.; Holness, H.; Furton, K. G.; Almirall, J. R.: Recent advances in micro-sample preparation with forensic applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 45, 264-279.
- [237] Wuethrich, A.; Haddad, P. R.; Quirino, J. P.: Green Sample Preparation for Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis of Anionic and Cationic Analytes. *Analytical Chemistry* 2015, 87, 4117-4123.
- [238] Majors, R. E.: An overview of sample preparation. *LC GC-Magazine of Separation Science* 1991, 9, 16-75

- [239] Ramos, L.: Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of chromatography. A* 2012, 1221, 84-98.
- [240] Pena, M. T.: Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias (Tesis Doctoral) Santiago de Compostela, 2010.
- [241] Brum, D. M.; Netto, A. D. P.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripui River, Ouro Preto, MG, Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 2009, 165, 447-453.
- [242] Pensado, L.; Blanco, E.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Martinez, E.; Carro, A. M.; Cela, R.: Strategic sample composition in the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 2004, 1056, 121-130.
- [243] USEPA: Method 550-Determination of PAHs in drinking water by liquid-liquid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection. 1990.
- [244] USEPA: Method 610-Polynuclear aromatic hidrocarbons. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. 2001.
- [245] Brum, D. M.; Cassella, R. J.; Netto, A. D. P.: Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* 2008, 74, 1392-1399.
- [246] Motelay-Massei, A.; Ollivon, D.; Garban, B.; Chevreuil, M.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk deposition at a suburban site: assessment by principal component analysis of the influence of meteorological parameters. *Atmospheric Environment* 2003, 37, 3135-3146.
- [247] Kwach, B. O.; Lalah, J. O.: High Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Found in Water and Sediments of Car Wash and Kisat Areas of Winam Gulf, Lake Victoria-Kenya. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2009, 83, 727-733.

- [248] Filipkowska, A.; Lubecki, L.; Kowalewska, G.: Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. *Analytica Chimica Acta* 2005, 547, 243-254.
- [249] Grimmer, G.; Brune, H.; Dettbarn, G.; Heinrich, U.; Jacob, J.; Mohtashamipur, E.; Norpoth, K.; Pott, F.; Wenzelhartung, R.: Urinary and fecal excretion of chrysene and chrysene metabolites by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Archives of Toxicology* 1988, 62, 401-405.
- [250] Garcia-Falcon, M. S.; Perez-Lamela, M.; Simal-Gandara, J.: Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 6897-6903.
- [251] Duedahl-Olesen, L.; Aaslyng, M.; Meinert, L.; Christensen, T.; Jensen, A. H.; Binderup, M. L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons [PAH] in Danish barbecued meat. *Food Control* 2015, 57, 169-176.
- [252] Barbeau, D.; Maitre, A.; Marques, M.: Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo a pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst* 2011, 136, 1183-1191.
- [253] Ahmadi, F.; Rezaei, H.; Tahvilian, R.: Computational-aided design of molecularly imprinted polymer for selective extraction of methadone from plasma and saliva and determination by gas chromatography. *Journal of chromatography. A* 2012, 1270, 9-19.
- [254] Beltran, A.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Cormack, P. A. G.: Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2010, 29, 1363-1375.
- [255] USEPA: Method 550.1-Determination of PAHs in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection. 1990.
- [256] He, Y.; Lee, H. K.: Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. *Analytical Chemistry* 1997, 69, 4634-4640.

- [257] Yao, C.; Pitner, W. R.; Anderson, J. L.: Ionic liquids containing the Tris [pentafluoroethyl] trifluorophosphate anion: a new class of highly selective and ultra hydrophobic solvents for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons sing single drop microextraction. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 5054-5063.
- [258] Merib, J.; Dias, A. N.; Simão, V.; Carasek, E.: Simultaneous determination of environmental contaminants with different volatilities in tap water samples using a new approach to single-drop microextraction procedure. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2015, 26, 1674-1683.
- [259] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseinia, M. R. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S.: Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* 2006, 1116, 1-9.
- [260] Gupta, M. K.; Jain, R.; Singh, P.; Ch, R.; Mudiam, M. K. R.: Determination of urinary PAH metabolites using DLLME hyphenated to injector port silylation and GC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 2015, 39, 365-373.
- [261] Hauser, B.; Schellin, M.; Popp, P.: Membrane-assisted solvent extraction of triazines, organochlorine, and organophosphorus compounds in complex samples combined with large-volume injection-gas chromatography/mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 6029-6038.
- [262] Prieto, A.; Telleria, O.; Etxebarria, N.; Fernandez, L. A.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O.: Simultaneous preconcentration of a wide variety of organic pollutants in water samples Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction. *Journal of Chromatography A* 2008, 1214, 1-10.
- [263] Rodil, R.; Schellin, M.; Popp, P.: Analysis of polycyclic-aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 2007, 1163, 288-297.

- [264] Kataoka, H.: Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 396, 339-364.
- [265] Campo, L.; Mercadante, R.; Rossella, F.; Fustinoni, S.: Quantification of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2009, 631, 196-205.
- [266] Huang, W. L.; Smith, C. J.; Walcott, C. J.; Grainger, J.; Patterson, D. G.: Comparison of sample preparation and analysis using solid-phase extraction and solid-phase microextraction to determine monohydroxy PAH in urine by GC/HRMS. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2002, 22, 339-351.
- [267] Mattarozzi, M.; Musci, M.; Careri, M.; Mangia, A.; Fustinoni, S.; Campo, L.; Bianchi, F.: A novel headspace solid-phase microextraction method using in situ derivatization and a diethoxydiphenylsilane fibre for the gas chromatography-mass spectrometry determination of urinary hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 5634-5639.
- [268] Smith, C. J.; Walcott, C. J.; Huang, W. L.; Maggio, V.; Grainger, J.; Patterson, D. G.: Determination of selected monohydroxy metabolites of 2-, 3- and 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by solid-phase microextraction and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002, 778, 157-164.
- [269] Yu, C. H.; Yao, Z. M.; Hu, B.: Preparation of polydimethylsiloxane/beta-cyclodextrin/divinylbenzene coated "dumbbell-shaped" stir bar and its application to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic sulfur heterocycles compounds in lake water and soil by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2009, 641, 75-82.

- [270] Lacorte, S.; Quintana, J.; Tauler, R.; Ventura, F.; Tovar-Sanchez, A.; Duarte, C. M.: Ultra-trace determination of Persistent Organic Pollutants in Arctic ice using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8581-8589.
- [271] Tienpont, B.; David, F.; Desmet, K.; Sandra, P.: Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 373, 46-55.
- [272] Desmet, K.; Tienpont, B.; Sandra, P.: Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in-situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption - Capillary gas chromatography - Mass spectrometry. *Chromatographia* 2003, 57, 681-685.
- [273] Cela, R.; Lorenzo, R. A.; Casais, M. C.: *Técnicas de separación en química analítica; Síntesis*, 2003.
- [274] Codina, G.; Vaquero, M. T.; Comellas, L.; Brotopuig, F.: Comparison of various extraction and cleanup methods for the determination of polycyclic aromatic-hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Journal of Chromatography A* 1994, 673, 21-29.
- [275] Pointet, K.; Milliet, A.: PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere* 2000, 40, 293-299.
- [276] Bordajandi, L. R.; Gomez, G.; Abad, E.; Rivera, J.; Fernandez-Baston, M. D.; Blasco, J.; Gonzalez, M. J.: Survey of persistent organochlorine contaminants [PCBs, PCDD/Fs, and PAHs], heavy metals [Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg], and arsenic in food samples from Huelva [Spain]: Levels and health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 992-1001.
- [277] Santos, M. D. R.; Cerqueira, M. R. F.; de Oliveira, M. A. L.; Matos, R. C.; Matos, M. A. C.: Box-Behnken design applied to ultrasound-assisted extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river sediments by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Methods* 2014, 6, 1650-1656.

- [278] Song, X. L.; Li, J. H.; Liao, C. Y.; Chen, L. X.: Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Low Solvent Consumption for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater by GC-MS. *Chromatographia* 2011, 74, 89-98.
- [279] Hernandez-Poveda, G. F.; Morales-Rubio, A.; Pastor-Garcia, A.; De la Guardia, M.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from cookies: A comparative study of ultrasound and microwave-assisted procedures. *Food Additives and Contaminants* 2008, 25, 356-363.
- [280] Barrado, A. I.; Garcia, S.; Castrillejo, Y.; Perez, R. M.: Hydroxy-PAH levels in atmospheric PM10 aerosol samples correlated with season, physical factors and chemical indicators of pollution. *Atmospheric Pollution Research* 2012, 3, 81-87.
- [281] Camel, V.: Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* 2001, 126, 1182-1193.
- [282] Miege, C.; Dugay, J.; Hennion, M. C.: Optimization and validation of solvent and supercritical fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1998, 823, 219-230.
- [283] Moreno, E.; Reza, J.; Trejo, A.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2007, 27, 239-260.
- [284] Sakamoto, T.; Yamamoto, A.; Owari, M.; Nihei, Y.: Supercritical fluid clean-up of environmental samples for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Analytical Sciences* 2004, 20, 1379-1382.
- [285] Ali, M. Y.; Cole, R. B.: One-step SFE-plus-C-18 selective extraction of low-polarity compounds, with lipid removal, from smoked fish and bovine milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 374, 923-931.

- [286] Han, Y. H.; Ren, L. M.; Xu, K.; Yang, F.; Li, Y. F.; Cheng, T. T.; Kang, X. M.; Xu, C. N.; Shi, Q.: Supercritical fluid extraction with carbon nanotubes as a solid collection trap for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *Journal of Chromatography A* 2015, 1395, 1-6.
- [287] Castells, P.; Santos, F. J.; Gaiceran, M. T.: Development of a sequential supercritical fluid extraction method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols. *Journal of Chromatography A* 2003, 1010, 141-151.
- [288] Li, K.; Woodward, L. A.; Karu, A. E.; Li, Q. X.: Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. *Analytica Chimica Acta* 2000, 419, 1-8.
- [289] Lopezavila, V.; Young, R.; Beckert, W. F.: Microwave-assisted extraction of organic-compounds from standard reference soils and sediments. *Analytical Chemistry* 1994, 66, 1097-1106.
- [290] Purcaro, G.; Moret, S.; Conte, L. S.: Optimisation of microwave assisted extraction [MAE] for polycyclic aromatic hydrocarbon [PAH] determination in smoked meat. *Meat Science* 2009, 81, 275-280.
- [291] Pena, T.; Pensado, L.; Casais, C.; Mejuto, C.; Phan-Tan-Luu, R.; Cela, R.: Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. *Journal of Chromatography A* 2006, 1121, 163-169.
- [292] Criado, A.; Cardenas, S.; Gallego, M.; Valcarcel, M.: Direct automatic screening of soils for polycyclic aromatic hydrocarbons based on microwave-assisted extraction/fluorescence detection and on-line liquid chromatographic confirmation. *Journal of Chromatography A* 2004, 1050, 111-118.
- [293] Baltrons, O.; Lopez-Mesas, M.; Palet, C.; Le Derf, F.; Portet-Koltalo, F.: Molecularly imprinted polymer-liquid chromatography/fluorescence for the selective clean-up of

hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Analytical Methods* 2013, 5, 6297-6305.

[294] Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N.; Pohl, C.: Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry* 1996, 68, 1033-1039.

[295] Houessou, J. K.; Delteil, C.; Camel, V.: Investigation of sample treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, 7413-7421.

[296] Yusa, V.; Pardo, O.; Marti, P.; Pastor, A.: Application of accelerated solvent extraction followed by gel performance chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue. *Food Additives and Contaminants* 2005, 22, 482-489.

[297] Lundstedt, S.; Haglund, P.; Oberg, L.: Simultaneous extraction and fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in soil using selective pressurized liquid extraction. *Analytical Chemistry* 2006, 78, 2993-3000.

[298] Barker, S. A.; Long, A. R.; Short, C. R.: Isolation of drug residues from tissues by solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography* 1989, 475, 353-361.

[299] Pena, M. T.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R.: Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Anal Chim Acta* 2008, 626, 155-65.

[300] Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* 2003, 86, 576-582.

[301] Pena, M. T.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R.: 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* 2007, 1165, 32-38.

[302] Olmos-Espejel, J. J.; de Llasera, M. P. G.; Velasco-Cruz, M.: Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo a pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2012, 1262, 138-147.

[303] Beach, D. G.; Quilliam, M. A.; Hellou, J.: Analysis of pyrene metabolites in marine snails by liquid chromatography using fluorescence and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009, 877, 2142-2152.

[304] Beach, D. G.; Quilliam, M. A.; Rouleau, C.; Croll, R. P.; Hellou, J.: Bioaccumulation and biotransformation of pyrene and 1-hydroxypyrene by the marine whelk *buccinum undatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2010, 29, 779-788.

[305] Kishikawa, N.; Wada, M.; Kuroda, N.; Akiyama, S.; Nakashima, K.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003, 789, 257-264.

[306] Gonzalez-Pinuella, C.; Alonso-Salces, R. M.; Andres, A.; Ortiz, I.; Viguri, J. R.: Validated analytical strategy for the determination of polycyclic aromatic compounds in marine sediments by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006, 1129, 189-200.

[307] Fabbri, D.; Vassura, I.; Sun, C. G.; Snape, C. E.; McRae, C.; Fallick, A. E.: Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a coastal lagoon by molecular and isotopic characterisation. *Marine Chemistry* 2003, 84, 123-135.

- [308] Villar, P.; Callejon, M.; Alonso, E.; Jimenez, J. C.; Guiraum, A.: Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction. *Analytica Chimica Acta* 2004, 524, 295-304.
- [309] Chen, B. H.; Wang, C. Y.; Chiu, C. P.: Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44, 2244-2251.
- [310] Poster, D. L.; Benner, B. A.; Schantz, M. M.; Sander, L. C.; Wise, S. A.; Vangel, M. G.: Determination of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulate-related standard reference materials. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2003, 23, 113-139.
- [311] Poster, D. L.; Schantz, M. M.; Sander, L. C.; Wise, S. A.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, 386, 859-881.
- [312] Zhang, G.; Pan, Z.; Wang, X.; Mo, X.; Li, X.: Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 2015, 187-195.
- [313] Romanoff, L. C.; Li, Z.; Young, K. J.; Blakely, N. C.; Patterson, D. G.; Sandau, C. D.: Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2006, 835, 47-54.
- [314] Wang, G. H.; Kawamura, K.; Zhao, X.; Li, Q. G.; Dai, Z. X.; Niu, H. Y.: Identification, abundance and seasonal variation of anthropogenic organic aerosols from a mega-city in China. *Atmospheric Environment* 2007, 41, 407-416.

- [315] de Boer, J.; Law, R. J.: Developments in the use of chromatographic techniques in marine laboratories for the determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* 2003, 1000, 223-251.
- [316] Riahi, K.; Sellier, N.: Separation of isomeric polycyclic aromatic hydrocarbons by GC-MS: Differentiation between isomers by positive chemical ionization with ammonia and dimethyl ether as reagent gases. *Chromatographia* 1998, 47, 309-312.
- [317] Yurchenko, S.; Molder, U.: The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Journal of Food Composition and Analysis* 2005, 18, 857-869.
- [318] Moyano, E.; McCullagh, M.; Galceran, M. T.; Games, D. E.: Supercritical fluid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for the analysis of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* 1997, 777, 167-176.
- [319] Kucklick, J. R.; Sivertsen, S. K.; Sanders, M.; Scott, G. I.: Factors influencing polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in South Carolina estuarine sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1997, 213, 13-29.
- [320] Li, X.; Fang, X. W.; Yu, Z. Q.; Sheng, G. Y.; Wu, M. H.; Fu, J. M.; Chen, H. W.: Direct analysis of urinary 1-hydroxypyrene using extractive electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* 2013, 5, 2816-2821.
- [321] Giessing, A. M. B.; Mayer, L. M.; Forbes, T. L.: 1-hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2003, 22, 1107-1114.
- [322] Lung, S. C. C.; Wu, M. J.; Lin, C. C.: Customers' exposure to PM_{2.5} and polycyclic aromatic hydrocarbons in smoking/nonsmoking sections of 24-h coffee shops in Taiwan. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 2004, 14, 529-535.

- [323] Bagheri, H.; Mohammadi, A.: Pyrrole-based conductive polymer as the solid-phase extraction medium for the preconcentration of environmental pollutants in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 2003, 1015, 23-30.
- [324] Hyotylainen, T.; Oikari, A.: Assessment of toxicity hazards of dredged lake sediment contaminated by creosote. *Science of the Total Environment* 1999, 243, 97-105.
- [325] Amorim, L. C. A.; Dimandja, J. M.; Cardeal, Z. D.: Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 2900-2904.
- [326] Vreuls, R. J. J.; Romijn, E.; Brinkman, U. A. T.: In-vial liquid-liquid extraction with subsequent large-volume on-column injection into CC-MS for the determination of anilines in tap, surface, and wastewater [vol 10, pg 581, 1998]. *Journal of Microcolumn Separations* 1999, 11, 81-81.
- [327] Purcaro, G.; Morrison, P.; Moret, S.; Conte, L. S.; Marriott, P. J.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid-phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007, 1161, 284-291.
- [328] Liu, K. L.; Heltsley, R.; Zou, D. H.; Pan, W. P.; Riley, J. T.: Polyaromatic hydrocarbon emissions in fly ashes from an atmospheric fluidized bed combustor using thermal extraction coupled with GC/TOF-MS. *Energy & Fuels* 2002, 16, 330-337.
- [329] Bouchard, M.; Normandin, L.; Gagnon, F.; Viau, C.; Dumas, P.; Gaudreau, E.; Tremblay, C.: Repeated measures of validated and novel biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in individuals living near an aluminum plant in Quebec, Canada. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 2009, 72, 1534-1549.
- [330] McRae, C.; Sun, C. G.; McMillan, C. F.; Snape, C. E.; Fallick, A. E.: Sourcing of fossil fuel-derived PAH in the environment. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2000, 20, 97-109.

- [331] Kim, M. K.; Kennicutt, M. C.; Qian, Y. R.: Polycyclic aromatic hydrocarbon purification procedures for compound specific isotope analysis. *Environmental Science & Technology* 2005, 39, 6770-6776.
- [332] USEPA: Compendium method TO-13A- Determination of PAHs in ambient air using GC/MS, compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air. 1999.
- [333] USEPA: EPA/600/R-95-131-Method for the determination of organic compounds in drinking water-supplement III. 1995.
- [334] USEPA: Method 610-Polynuclear aromatic hydrocarbons, part 136 guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants; appendix A: methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. 2005.
- [335] USEPA: SW-846-Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. 1980.
- [336] USEPA: Methods for sampling and analyzing contaminants in fish and shellfish tissue, guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisores. 1993.
- [337] Shahtaheri, S. J.; Ibrahimi, L.; Goldbabaiei, F.; Hosseini, M.; Fouladi Dehghi, B.: Solid phase extraction for 1-hydroxypyrene as a biomarker of occupational exposure to PAHs prior to high performance liquid chromatography. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition* 2007, 26, 75-81.
- [338] Simon, P.; Morele, Y.; Delsaut, P.; Nicot, T.: Automated column-switching high-performance liquid chromatography method for the determination of 1-hydroxypyrene in human urine. *Journal of Chromatography B* 1999, 732, 91-101.
- [339] Wang, Y.; Zhang, W. B.; Dong, Y. L.; Fan, R. F.; Sheng, G. Y.; Fu, J. M.: Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-

performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, 383, 804-809.

[340] Madhavan, N. D.; Naidu, K. A.: Polycyclic aromatic-hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical-cord blood and milk of indian women. *Human & Experimental Toxicology* 1995, 14, 503-506.

[341] Danyi, S.; Brose, F.; Brasseur, C.; Schneider, Y. J.; Larondelle, Y.; Pussemier, L.; Robbens, J.; De Saeger, S.; Maghuin-Rogister, G.; Scippo, M. L.: Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Analytica Chimica Acta* 2009, 633, 293-299.

[342] Ferrari, S.; Mandel, F.; Berset, J. D.: Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Chemosphere* 2002, 47, 173-182.

[343] Roda, A.; Simoni, P.; Mirasoli, M.; Baraldini, M.; Violante, F. S.: Development of a chemiluminescent enzyme immunoassay for urinary 1-hydroxypyrene. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 372, 751-758.

[344] Grainger, J.; Huang, W. L.; Li, Z.; Edwards, S.; Walcott, C.; Smith, C.; Turner, W.; Wang, R.; Patterson, D. G.: Polycyclic aromatic hydrocarbon reference range levels in the US population by measurement of urinary mono-hydroxy metabolites. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2005, 25, 47-65.

[345] Andre Amorim, L. C.; Dimandja, J.-M.; Cardeal, Z. d. L.: Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 2900-2904.

[346] Ramsauer, B.; Sterz, K.; Hagedorn, H.-W.; Engl, J.; Scherer, G.; McEwan, M.; Errington, G.; Shepperd, J.; Cheung, F.: A liquid chromatography/tandem mass spectrometry [LC-MS/MS]

method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons [OH-PAH] in urine of non-smokers and smokers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011, 399, 877-889.

[347] Ferey, L.; Delaunay, N.; Rutledge, D. N.; Cordella, C. B.; This, H.; Huertas, A.; Raoul, Y.; Gareil, P.: Optimizing separation conditions of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and applications to edible oils. *Talanta* 2014, 119, 572-81.

[348] Cahours, X.; Blanchet, M.; Rey, M.: Fast and simple method for the determination of urinary 1-hydroxypyrene. *Journal of Separation Science* 2009, 32, 3403-3410.

[349] Giessing, A. M. B.; Mayer, L. M.; Forbes, T. L.: Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. *Marine Environmental Research* 2003, 56, 599-615.

[350] Goen, T.; Gundel, J.; Schaller, K. H.; Angerer, J.: The elimination of 1-hydroxypyrene in the urine of the general-population and workers with different occupational exposures to pah. *Science of the Total Environment* 1995, 163, 195-201.

[351] Huang, W.; Ding, J.; Feng, Y.-Q.: Magnetic Solid Phase Extraction Followed by High Performance Liquid Chromatography for Determination of Urinary 1-Hydroxypyrene. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2012, 40, 830-834.

[352] Jongeneelen, F. J.: Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Science of The Total Environment* 1997, 199, 141-149.

[353] Schummer, C.; Appenzeller, B. M. R.; Millet, M.; Wennig, R.: Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human hair by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 6012-6019.

[354] Toriba, A.; Nakamura, H.; Chetianukornkul, T.; Kizu, R.; Makino, T.; Nakazawa, H.; Yokoi, T.; Hayakawa, K.: Method for determining monohydroxybenzo a pyrene isomers using

column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2003, 312, 14-22.

[355] Viau, C.; Diakite, A.; Ruzgite, A.; Tuchweber, B.; Blais, C.; Bouchard, M.; Vyskocil, A.: Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions? *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002, 778, 165-177.

[356] Yang, H. M.; Wang, Y. S.; Li, J. H.; Li, G. R.; Wang, Y.; Tan, X.; Xue, J. H.; Xiao, X. L.; Kang, R. H.: Synchronous fluorescence determination of urinary 1-hydroxypyrene, beta-naphthol and 9-hydroxyphenanthrene based on the sensitizing effect of beta-cyclodextrin. *Analytical Chimica Acta* 2009, 636, 51-7.

[357] Fan, R. F.; Dong, Y. L.; Zhang, W. B.; Wang, Y.; Yu, Z. Q.; Sheng, G. Y.; Fu, J. M.: Fast simultaneous determination of urinary 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo a pyrene by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2006, 836, 92-97.

[358] Kuusimäki, L.; Peltonen, Y.; Mutanen, P.; Peltonen, K.; Savela, K.: Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2004, 77, 23-30.

[359] Plaza-Bolaños, P.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. *Analytical methods and trends. Journal of Chromatography. A* 2010, 1217, 6303-26.

[360] Martínez, S. R.: Exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos en población infantil (Tesis Doctoral) Universidad Autónoma de San Luis de Potosí, 2006.

[361] Zhao, G.; Chen, Y. S.; Wang, S.; Yu, J. J.; Wang, X. Y.; Xie, F. W.; Liu, H. M.; Xie, J. P.: Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta* 2013, 116, 822-826.

-
- [362] Miller, J. C. M., J.N.: Estadística para Química Analítica: Wilmington, 1993.
- [363] Krupadam, R. J.; Bhagat, B.; Khan, M. S.; Wate, P. S.: Molecularly Imprinted Nanoporous Polyacrylate Surface for Benzo[alpha]Pyrene Recognition. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2009, 9, 5441-5447.
- [364] Bravo, J. C.; Fernandez, P.; Durand, J. S.: Flow injection fluorimetric determination of beta-estradiol using a molecularly imprinted polymer. *Analyst* 2005, 130, 1404-1409.
- [365] García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E.: Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007, 123, 1180-1194.
- [366] Letellier, M.; Budzinski, H.: Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* 1999, 27, 259-271.
- [367] Ganzler, K.; Salgo, A.; Valko, K.: Microwave extraction - a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography* 1986, 371, 299-306.
- [368] Dean, J. R.; Barnabas, I. J.; Fowles, I. A.: Extraction of polycyclic aromatic-hydrocarbons from highly contaminated soils - a comparison between soxhlet, microwave and supercritical-fluid extraction techniques. *Analytical Proceedings* 1995, 32, 305-308.
- [369] Barnabas, I. J.; Dean, J. R.; Fowles, I. A.; Owen, S. P.: Extraction of polycyclic aromatic-hydrocarbons from highly contaminated soils using microwave-energy. *Analyst* 1995, 120, 1897-1904.
- [370] Chee, K. K.; Wong, M. K.; Lee, H. K.: Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography fluorescence detection and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1996, 723, 259-271.
- [371] Hasty, E.; Revesz, F.: Total petroleum hydrocarbon determination by microwave solvent-extraction. *American Laboratory* 1995, 27, 66-&.

- [372] Budzinski, H.; Baumard, P.; Papineau, A.; Wise, S.; Garrigues, P.: Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediments and biological tissues. *Polycyclic Aromatic Compounds* 1996, 9, 225-232.
- [373] Soxhlet, F.: Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingers Polytech J* 1879, 232, 461.
- [374] Krinsley, D. H.; Pye, K.; Boggs, S.; Tovey, N. K.: *Backscattered Scanning Electron Microscopy and Image Analysis of Sediments and Sedimentary Rocks*; Cambridge University Press, 2005.
- [375] Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Naenna, T.; Prachayasittikul, V.: Quantitative structure-imprinting factor relationship of molecularly imprinted polymers. *Biosensors & Bioelectronics* 2007, 22, 3309-3317.
- [376] Baggiani, C.; Giraudi, G.; Giovannoli, C.; Tozzi, C.; Anfossi, L.: Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template - Indirect evidence of the formation of template clusters in the binding site. *Analytica Chimica Acta* 2004, 504, 43-52.
- [377] Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y. Z.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D.: Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analytical Chemistry* 2001, 73, 4584-4591.
- [378] Cacho, C.; Turiel, E.; Martin-Esteban, A.; Perez-Conde, C.; Camara, C.: Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 802, 347-353.
- [379] Turiel, E.; Perez-Conde, C.; Martin-Esteban, A.: Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analyst* 2003, 128, 137-141.

- [380] Campo, L.; Rossella, F.; Fustinoni, S.: Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2008, 875, 531-540.
- [381] Steen, R.; Hogenboom, A. C.; Leonards, P. E. G.; Peerboom, R. A. L.; Cofino, W. P.; Brinkman, U. A. T.: Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1999, 857, 157-166.
- [382] Pocurull, E.; Brossa, L.; Borrull, F.; Marce, R. M.: Trace determination of antifouling compounds by on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2000, 885, 361-368.
- [383] Pichon, V.: Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A* 2007, 1152, 41-53.
- [384] Tamayo, F. G.; Turiel, E.; Martin-Esteban, A.: Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. *Journal of chromatography. A* 2007, 1152, 32-40.
- [385] Rodríguez Fernández, R.: Desarrollo de un polímero de impronta molecular para la determinación del metilmercurio en productos pesqueros. (Tesis Doctoral) Universidad de Santiago de Compostela y Universidad de Vigo, 2012.
- [386] Cacho, C.; Turiel, E.; Martin-Esteban, A.; Ayala, D.; Perez-Conde, C.: Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. *Journal of Chromatography A* 2006, 1114, 255-262.
- [387] Gündel, J.; Mannschreck, C.; Büttner, K.; Ewers, U.; Angerer, J.: Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1996, 31, 585-590.

- [388] Angerer, J.; Mannschreck, C.; Gundel, J.: Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. *Int Arch Occup Environ Health* 1997, 69, 323-31.
- [389] Rossbach, B.; Preuss, R.; Letzel, S.; Drexler, H.; Angerer, J.: Biological monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [PAH] by determination of monohydroxylated metabolites of phenanthrene and pyrene in urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2007, 81, 221-229.
- [390] Urbieta, M. E., I. Montes, J: Exposición a HAPs y Control biológico: determinación simultánea de HAPs hidroxilados en orina. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo (INSHT) 2000.
- [391] Rodriguez-Mozaz, S.; Lopez de Alda, M. J.; Barcelo, D.: Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of chromatography. A* 2007, 1152, 97-115.
- [392] Clavijo, S.; Avivar, J.; Suarez, R.; Cerda, V.: Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2015, 67, 26-33.
- [393] Zagatto, E. A. G.; Oliveira, C. C.; Collins, C. H.: Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994). *Química Nova* 1999, 22, 143-146.
- [394] Skeggs, J. L. T.: An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 1957, 28, 311.
- [395] Pasquini, C.; De Oliveira, W. A.: Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium[VI], ammonia and phosphorus. *Analytical Chemistry* 1985, 57, 2575-2579.
- [396] Ruzicka, J.; Marshall, G. D.: Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* 1990, 237, 329-343.

- [397] Ródenas-Torralba, E.; Cava-Montesinos, P.; Morales-Rubio, Á.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M.: Multicommutation as an environmentally friendly analytical tool in the hydride generation atomic fluorescence determination of tellurium in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, 379, 83-89.
- [398] Linder van der, W. E.: Classification and definition of analytical methods based on flowing media. *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)* 1994, 66, 2493-2500.
- [399] Ruzicka, J.; Hansen, E. H.: Flow injection analyses new concept of fast continuous-flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 1975, 78, 145-157.
- [400] Stewart, K. K.; Beecher, G. R.; Hare, P. E.: Rapid analysis of discrete samples - use of non-segmented, continuous-flow. *Analytical Biochemistry* 1976, 70, 167-173.
- [401] Kubáň, V.: Gas Diffusion/Permeation Flow Injection Analysis. Part I. Principles and Instrumentation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 1992, 23, 323-354.
- [402] Pradana, J. A.: Aplicaciones analíticas de las hidracidas quinoleínica, cincomerónica y 2,3-pirazindicarboxílica mediante técnicas de flujo continuo y detección quimioluminiscente. (Tesis Doctoral) Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), 2011.
- [403] Gómez-Taylor Corominas, B.: Nuevos métodos de análisis en flujo (F.I.A y multiconmutación) aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles. (Tesis Doctoral) Universitat de Valencia, 2003.
- [404] Diaz, T. G.; Valenzuela, M. I. A.; Salinas, F.: Determination of the pesticide Naptalam, at the ppb level, by FIA with fluorimetric detection and on-line preconcentration by solid-phase extraction on C-18 modified silica. *Analytica Chimica Acta* 1999, 384, 185-191.
- [405] Andrew, K. N.; Sanders, M. G.; Forbes, S.; Worsfold, P. J.: Flow methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using low power photomultiplier tube and charge coupled device chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* 1997, 346, 113-120.

- [406] Zhou, Y. Y.; Yan, X. P.; Kim, K. N.; Wang, S. W.; Liu, M. G.: Exploration of coordination polymer as sorbent for flow injection solid-phase extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental materials. *Journal of Chromatography A* 2006, 1116, 172-178.
- [407] Hashi, Y.; Wang, T. R.; Li, Y. Q.; Lin, J. M.: On-line enrichment and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulates using high performance liquid chromatography with fluorescence as detector. *Journal of Environmental Sciences-China* 2007, 19, 1261-1265.
- [408] Lim, L. W.; Okouchi, Y.; Takeuchi, T.: On-line preconcentration of trace carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in microcolumn liquid chromatography via large volume injection. *Talanta* 2007, 72, 1600-1608.
- [409] Li, C. F.; Wong, J. W. C.; Huie, C. W.; Choi, M. M. F.: On-line flow injection-cloud point preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2008, 1214, 11-16.
- [410] Wu, H.; Wang, X. C.; Liu, B.; Lu, J.; Du, B. X.; Zhang, L. X.; Ji, J. J.; Yue, Q. Y.; Han, B. P.: Flow injection solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes packed micro-column for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 2911-2917.
- [411] Lamotte, M.; Belfutmi, R.; de Violet, P. F.; Garrigues, P.; Lafontaine, M.; Dumas, C.: Detection of 1-hydroxypyrene in urine by direct fluorometric analysis on a solid sorbing phase. Validation and application of the method to biological monitoring of PAH-exposed persons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, 376, 816-821.
- [412] Boos, K.-S.; Lintelmann, J.; Kettrup, A.: Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1-hydroxypyrene in urine of subjects exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* 1992, 600, 189-194.

- [413] González, G. P.; Hernando, P. F.; Durand Alegría, J. S.: Determination of digoxin in serum samples using a flow-through fluorosensor based on a molecularly imprinted polymer. *Biosensors and Bioelectronics* 2008, 23, 1754-1758.
- [414] Suarez-Rodriguez, J. L.; Diaz-Garcia, M. E.: Flavonol fluorescent flow-through sensing based on a molecular imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta* 2000, 405, 67-76.
- [415] Serrano, M.; Bartolome, M.; Gallego-Picó, A.; Garcinuno, R. M.; Bravo, J. C.; Fernandez, P.: Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the isolation of 1-hydroxypyrene in human urine. *Talanta* 2015, 143, 71-76.
- [416] Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S.: Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, 263-268.
- [417] Guiavarc'H, Y. P.; Chahin, A.; Dziurla, M. A.; Yen, F. T.; Jondreville, C.; Rychen, G.: Erod activity in peripheral blood lymphocytes and 1-hydroxypyrene in urine and milk as biomarkers of pah exposure in dairy ruminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2011, 30, 1346-1353.
- [418] Barker, S. A.: Matrix solid phase dispersion [MSPD]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2007, 70, 151-62.
- [419] Curren, M. S. S.; King, J. W.: Ethanol-modified subcritical water extraction combined with solid-phase microextraction for determining atrazine in beef kidney. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, 2175-2180.
- [420] Blasco, C.; Font, G.; Pico, Y.: Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004, 1028, 267-276.

- [421] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Lagana, A.: Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography. A* 2010, 1217, 2521-32.
- [422] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Laganà, A.; Piovesana, S.; Samperi, R.: Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 43, 53-66.
- [423] Cámara, C.; Fernández, P.; Martín-Esteban, A.; Pérez-Conde, C.; Vidal, M.: Toma y tratamiento de muestras; Síntesis, 2002.
- [424] Turiel, E.; Martín-Esteban, A.: Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. *Analalytica Chimica Acta* 2010, 668, 87-99.
- [425] Aquino, A.; Navickiene, S.: MSPD procedure for determination of carbofuran, pyrimethanil and tetraconazole residues in banana by GC-MS. *Chromatographia* 2009, 70, 1265-1269.
- [426] Barker, S. A.: Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A* 2000, 880, 63-68.
- [427] Kristenson, E. M.; Ramos, L.; Brinkman, U. A. T.: Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2006, 25, 96-111.
- [428] Ziakova, A.; Brandsteterova, E.; Blahova, E.: Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A* 2003, 983, 271-275.
- [429] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Lagana, A.: Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 2521-2532.
- [430] Garcia-Lopez, M.; Canosa, P.; Rodriguez, I.: Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 391, 963-974.
- [431] Wang, S. T.; Mu, H.; Bai, Y. H.; Zhang, Y. W.; Liu, H. L.: Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine

tissue using MSPD and HPLC-DAD. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009, 877, 2961-2966.

[432] Abhilash, P. C.; Singh, V.; Singh, N.: Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion [MSPD] followed by GC-ECD. *Food Chemistry* 2009, 113, 267-271.

[433] Campíns-Falcó, P.; Verdú-Andrés, J.; Sevillano-Cabeza, A.; Molins-Legua, C.; Herráez-Hernández, R.: 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* 2008, 1211, 13-21.

[434] Sanchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Tadeo, J. L.: 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* 2007, 1148, 219-227.

[435] Fernandez-Gonzalez, V.; Concha-Grana, E.; Muniategui-Lorenzo, S.; Lopez-Mahia, P.; Fernandez-Fernandez, E.; Prada-Rodriguez, D.: A matrix solid-phase dispersion-gel permeation chromatography-programmed temperature vaporisation-GC-MS procedure for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel samples. *Journal of Separation Science* 2010, 33, 3741-3750.

[436] Olson, G. M.; Meyer, B. M.; Portier, R. J.: Adaptation of sonication-assisted matrix solid phase dispersion of tissues for the subsequent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from Gulf Menhaden (*Brevoortia patronus*). *Biochemistry Research International* 2014, 1-7.

[437] Furusawa, N.: A toxic reagent-free method for normal-phase matrix solid-phase dispersion extraction and reversed-phase liquid chromatographic determination of aldrin, dieldrin, and DDTs in animal fats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, 378, 2004-2007.

- [438] Torres, C. M.; Pico, Y.; Manes, J.: Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1997, 778, 127-137.
- [439] Ho, T. D.; Zhang, C.; Hantao, L. W.; Anderson, J. L.: Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. *Analytical Chemistry* 2014, 86, 262-285.
- [440] Ruiz-Aceituno, L.; Sanz, M. L.; Ramos, L.: Use of ionic liquids in analytical sample preparation of organic compounds from food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 43, 121-145.
- [441] Khajeh, M.; Yan, H.; Arefnejad, E.; Bohlooli, M.: Matrix solid-phase dispersion with chitosan-zinc oxide nanoparticles combined with flotation-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 13 n-alkanes in soil samples. *Journal of Separation Science* 2014, 37, 3292-3298.
- [442] Khajeh, M.; Laurent, S.; Dastafkan, K.: Nanoadsorbents: Classification, preparation, and applications (with Emphasis on Aqueous Media). *Chemical Reviews* 2013, 113, 7728-7768.
- [443] Gañán, J.; Morante-Zarcero, S.; Gallego-Picó, A.; Garcinuno, R. M.; Fernandez-Hernando, P.; Sierra, I.: Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. *Talanta* 2014, 126, 157-162.
- [444] Perret, D.; Gentili, A.; Marchese, S.; Sergi, M.; D'Ascenzo, G.: Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion. *Journal of Aoac International* 2002, 85, 724-730.
- [445] Pensado, L.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R.: Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A* 2005, 1077, 103-109.

- [446] García-Mayor, M. A.; Gallego-Picó, A.; Garcinuno, R. M.; Fernandez-Hernando, P.; Durand-Alegria, J. S.: Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *Food Chemistry* 2012, 134, 553-558.
- [447] Muñoz, D.; Ávila, A.; Barrón, J.; Carrera, C.: Materiales emergentes para su potencial aplicación en dispersión de matriz en fase sólida. *INVURNUS* 2011, 6, 22-30.
- [448] Long, A. R.; Hsieh, L. C.; Malbrough, M. S.; Short, C. R.; Barker, S. A.: Multiresidue method for isolation and liquid-chromatographic determination of 7 benzimidazole anthelmintics in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1989, 72, 739-741.
- [449] Long, A. R.; Short, C. R.; Barker, S. A.: Method for the isolation and liquid-chromatographic determination of 8 sulfonamides in milk. *Journal of Chromatography* 1990, 502, 87-94.
- [450] Long, A. R.; Hsieh, L. C.; Malbrough, M. S.; Short, C. R.; Barker, S. A.: Matrix solid-phase dispersion [mspd] isolation and liquid-chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1990, 73, 379-384.
- [451] Gañán, J.; Gallego-Picó, A.; Garcinuno, R. M.; Fernandez-Hernando, P.; Morante, S.; Sierra, I.; Durand, J. S.: Development of a molecularly imprinted polymer-matrix solid-phase dispersion method for selective determination of beta-estradiol as anabolic growth promoter in goat milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 403, 3025-3029.

VII. Anexos



VIII. ANEXOS

CONGRESOS



XVIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Úbeda, 16-18 junio 2013



DEVELOPMENT OF A MISPE PROCEDURE FOR SELECTIVE DETERMINATION OF
1-HYDROXYPYRENE IN HUMAN URINE SAMPLES

M. Serrano, A. Gallego, R.M. Garcinuño, D. González, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand

Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Paseo Senda del Rey, 9, 28040, Madrid, jdurand@ccia.uned.es

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a large group of organic pollutants and are considered compounds with great concern in recent years because of their high carcinogenicity, genotoxicity and ubiquitousness in the environment. The risk associated with priority PAHs was recognized by US Environmental Protecting Agency (US-EPA), European Food Safety Authority (ESFA) and Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA) [1-3] and the analysis of priority PAHs have been recommended. Furthermore, several studies proposed the use of the urinary 1-hidroxyppyrene (1-OHP) as a biomarker of exposure to pyrene and other PAHs, which can be used as low cost and time consuming preliminary studies before exhaustive analytical investigation of priority PAHs [4].

Our study describes the synthesis of a specific molecularly imprinted polymer (MIP) for 1-OHP using methacrylic acid (MAA) as functional monomer, ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as crosslinker and acetonitrile as porogen, by precipitation polymerisation strategy. Molecularly imprinted polymer and solid-phase extraction (SPE) were combined to create a novel sample pretreatment technique (MISPE) for chemical analysis of 1-OHP in human urine samples followed by high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-LD).

The optimised MISPE protocol involved conditioning of the cartridge with acetonitrile before loading the sample and washing with acetonitrile and water (95:5). The analyte was eluted with methanol-dichloromethane mixture (85:15). Under these conditions, 1-OHP recoveries were between 100-102 % and relative standard deviations ranging from 0.9 to 2.9 %. The applicability of the developed MISPE method to determine 1-OHP in spiked human urine samples was demonstrated. The methodology was validated and limits of detection and quantification were 0.050 ng/mL and 0.168 ng/mL, respectively. Compared with conventional extraction methods, the MISPE extraction procedure is superior in terms of time and labor, presenting high accuracy, precision and sensitivity. In addition, this procedure offers low cost and can be easily employed in most routine laboratories. The results were entirely satisfactory and could be used for assigning levels of exposure to PAHs.

This work was supported by project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II (Comunidad de Madrid, Spain)

References:

- [1] US-EPA, Polynuclear Hydrocarbons, vol. 10, US-EPA, Washington, Dc, 1984.
- [2] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, EU, Brussels, 2002. SCF/CS/CNTM/PAG/29/Final. (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html)
- [3] JECFA, Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-Fourth meeting, Rome, 2005, JECFA/64/SC. (ftp://ftp.fao.org/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf)
- [4] S. Llop, F. Ballester, M. Estarlich, J. Ibarluzea, A. Manriquee, M. Rebagliato, A. Esplugues, C. Iñiguez, Sci Total Environ 407 (2008) 97



**DIOXIN
MADRID
2014**



EVALUATION OF A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS SOLID PHASE EXTRACTION SORBENT FOR THE SELECTIVE DETERMINATION OF 1-HIDROXYPYRENE FROM HUMAN URINE SAMPLES

Serrano M, Bartolomé M, Gallego A, Garcinuño RM*, Fernández-Hernando P, Durand-Alegría JS

Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance Education (UNED), 28040 Madrid, Spain

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a large group of compounds containing two or more fused aromatic rings, extensively distributed in the air, in soil, in water, in food and in many occupational environments. PAHs ubiquity and carcinogenic and mutagenic potential have received great concern in the last decades and have generated, from toxicological viewpoint, great interest¹. Usually, biomonitoring of PAHs exposure is based on the measurement of urinary hydroxylated metabolites (OH-PAHs) and several biomarkers have been proposed². However, 1-hydroxypyrene (1-OHP) is commonly used as a biological indicator of exposure to PAHs in many studies in environmental and occupational health³. It is the principal metabolite of the four-ring PAH pyrenes, representing 90% of the urinary excretion of pyrenes in humans⁴.

In this research, a selective sample pretreatment procedure using a molecularly imprinted polymer (MIP) packed in solid phase extraction (SPE) cartridge has been developed for the analysis of 1-OHP from human urine samples. MIP for 1-OHP was synthesized by precipitation polymerisation using methacrylic acid (MAA) as functional monomer, ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as crosslinker and acetonitrile as porogen. The morphology of the MIP was examined by scanning electron microscopy (SEM). Parameters affecting the extraction efficiency of the MIP have been evaluated, including loading, washing and elution solvents. MIP selectivity was studied by checking other hydroxylated metabolites of PAHs (1-hydroxyphenanthrene, 2-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxyphenanthrene, 4-hydroxyphenanthrene). Results demonstrated that the MIP has specific affinity for the template. The optimised molecular imprinted SPE (MISPE) procedure was applied to extract 1-OHP directly from human urine samples. High performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FLD) was used for quantification of analytes. The proposed method allowed the efficient and selective extraction of 1-OHP, obtaining analyte recoveries at three concentration levels ranged from 97 to 107 % with relative standard deviation (RSD) less than 3 %. The results showed good linearity and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in human urine samples were 0.050 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.168 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. This method is simple, sensitive and selective, and offers an alternative tool to assign levels of exposure to PAHs.

Acknowledgements

This work was supported by project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II (Comunidad de Madrid, Spain)

References:

1. IARC (2010); *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 92: 1-868
2. Wilhelm M, Hardt J, Schulz C, Angerer J. (2008); *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 211:447-453
3. Wang Y, Zhang W, Dong Y, Fan R, Sheng G, Fu J. (2005); *Anal. Bional Chem.* 383: 804-809
4. Brzezniński S, Jakubowski M, Czernski B. (1997). *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 70: 257-260.

**P60**

On-line flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the preconcentration and determination of 1-hidroxypyrene

M. Serrano¹, J.C. Bravo¹, A. Gallego¹, G. Paniagua¹, R.M. Garcinuño¹, P. Fernández¹
¹National University of Distance Education, Analytical Sciences, Madrid, Spain
agallego@ccia.uned.es

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a large group of pollutants extensively distributed in air, soil, water, food and many occupational environments. Some of these compounds have been associated with genotoxicity and carcinogenicity in humans. 1-hydroxypyrene (1-OHP) has been suggested as main exposure biomarker for PAHs in many studies in environmental and occupational health. When large numbers of samples have to be analyzed, simple, cheap and efficient methods are desirable.

In the case of 1-OHP conventional fluorescence spectroscopy is a good choice with an excellent sensitivity. However, preliminary preconcentration or separation is usually required. One of the most promising options is to incorporate molecularly imprinted polymers (MIPs) into sample preparation. MIPs have molecular recognition abilities, possessing specific binding sites and high selectivity for a particular molecule.

In this work, an 1-OHP MIP was synthesized using 1-OHP as template, methacrylic acid (MAA) as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGMA) as cross-linker, and acetonitrile as porogen. MIP was placed into a Teflon microcolumn coupled with a flow injection configuration for the determination of 1-OHP in human urine by spectrofluorimetric detection.

Several variables including washing and elution solvents and FI parameters were optimized to achieve the selective isolation of 1-OHP. With this configuration, a single method for continuous-flow determination of 1-OHP based on the measurement of its native fluorescence was established.



Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the isolation of 1-hydroxypyrene in human urine



M. Serrano, M. Bartolomé, A. Gallego-Picó*, R.M. Garcinuño, J.C. Bravo, P. Fernández

Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance Education (UNED), E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2014

Received in revised form

23 April 2015

Accepted 30 April 2015

Available online 8 May 2015

Keywords:

1-Hydroxypyrene

MISPE

HPLC-FLD

Urine

ABSTRACT

In the last decades, the assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons' exposure has generated great interest and 1-hydroxypyrene (1-OHP) has been commonly used as a biological indicator of exposure to PAHs in many studies in environmental and occupational health. In this research, a molecularly imprinted polymer (MIP) was synthesised by precipitation polymerisation using 1-OHP as template, methacrylic acid (MAA) as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker, and acetonitrile as porogen. MIP was used as solid-phase extraction (SPE) material for sample pre-treatment and isolation of 1-OHP and posterior detection in a reversed-phase HPLC-FLD. Various parameters including washing solvent, elution solvent and volume affecting the extraction efficiency of the polymer have been evaluated to achieve the isolation of 1-OHP from urine samples and to reduce non-specific interactions. Cross-selectivity was studied in the presence of other structural analogues of the 1-OHP as hydroxyphenanthrene isomers.

The method was validated over a concentration range of 0.15–2.00 $\mu\text{g L}^{-1}$, $R^2 > 0.998$. Recovery values were in the range of 78–90% and RSD < 6.7%. The limits of detection and quantification were 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.17 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

In our knowledge, it is the first time that this methodology is applied for analysing urinary hydroxypyrene and it has been demonstrated that this specific MISPE-HPLC-FLD method offers a fast and simple alternative to determine 1-OHP in human urine samples.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a large group of compounds extensively distributed in air, soil, water, food and many occupational environments. For the general population, the major routes of exposure to PAHs are from diet, smoking and indoor air [1,2]. PAHs ubiquity and carcinogenic and mutagenic potential [3] have received great concern in the last decades and have generated, from toxicological viewpoint, great interest [4]. The PAHs metabolism is complex and they are quickly biotransformed to hydroxylated metabolites (phase I), and then further are transformed to glucuronide or sulphate conjugates (phase II) [5–7]. Usually, biomonitoring of PAHs exposure is based on the measurement of urinary hydroxylated metabolites (OH-PAHs) and several biomarkers have been proposed [4,8–10]. However, 1-hydroxypyrene (1-OHP) is commonly used as a biological indicator of exposure to PAHs in many studies in environmental and occupational health [11,12]. Although some authors have

questioned 1-hydroxypyrene as a reliable bioindicator of measured dietary PAH [13], in a subsequent review, the concentration profile of OH-PAHs excreted in urine, as well as correlations among different OH-PAH analytes, was evaluated and the authors concluded that the highest concentration of urinary PAH exposure was the major factor determining high urinary concentration of 1-OHP [14]. The results of this and other studies have demonstrated that 1-OHP may be now largely considered a solid biomarker of exposure to pyrene and other PAHs, as pyrene is found in most PAH mixtures [7,11,14,15].

In the last years, many analytical methods have been published for the determination of 1-OHP and other hydroxylated metabolites in human and animal samples [7] including chemiluminescent enzyme-immunoassay [16], gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), or coupled to high-resolution mass spectrometry (CG-HRMS) [17–19], two-dimensional gas chromatography with a flame ionisation detector (GCxGC) [20], and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [21–23]. Synchronous fluorescence spectrometry (SFS) has also been proposed as screening method [24–27]. However liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD) has been extensively applied for determination of 1-OHP in very different matrices

* Corresponding author. Tel.: +34 91 398 73 64; fax: +34 91 398 83 79.

E-mail address: agallego@ccia.uned.es (A. Gallego-Picó).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.092>

0039-9140/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

[9,10,28,29], since it is a cheap and simple technique, in comparison to others. On the other hand, LC-FLD is as sensitive as other methods and can be easily employed in most routine laboratories. Nevertheless the most important challenge in the analysis of OH-PAHs and other trace contaminants is the extraction and isolation of analytes from complex matrices, thus new selective methods are required in order to achieve low concentration levels [30,31]. Accordingly, several analytical methodologies have been proposed to improve the sensitivity and specificity in the OH-PAHs determination. Solid-phase extraction (SPE) with different types of sorbents [6,10,17,23,32,33], immunoextraction [34], solid phase microextraction (SPME) [35,36], stir bar sorptive extraction (SBSE) [5,37] and liquid–liquid extraction (LLE) [20,32] have been used as sample pretreatments. In addition, fluorometric analysis on solid sorbent elements has been also studied [25] and other pretreatment systems have been proposed [38].

Recent trends in sample preparation and purification include the development of advanced adsorbent materials. Different reviews have presented the significant increase in the use of molecularly imprinted polymers (MIPs) as selective materials for solid-phase extraction and other sample treatments [39,40]. Compared with traditional sorbents, MIPs are the most effective sorbents and have been successfully applied to the isolation of analytes in foods, biological and environmental samples in the last years.

Despite this, new polymerisation strategies need to be explored to improve MIPs efficiency. Bulk polymerisation has traditionally been used for preparing MIPs. Moreover, it is necessary to crush and sieve the polymer to generate particles with an appropriate size for use. This process affects the imprinted sites and MIPs present a heterogeneous binding site distribution limiting their applicability range [39,41]. To overcome these limitations, new polymerisation strategies have been studied to obtain MIPs with proper physical characteristics (size, porosity, pore volume, and area) [41]. On the other hand, only some of these alternatives have been used for the preparation of MISPE protocols [39], such as multi-step swelling and polymerisation and precipitation polymerisation [41]. In this context, precipitation polymerisation seems to be an attractive and easy method.

To our knowledge, MIP applications in the analytical determination of PAHs are limited [42,43] and in the literature, only two works reported the application of MIP for the determination of hydroxylated metabolites in soils [44] and microalgae cultures [45].

In this study, 1-OHP molecularly imprinted polymer was synthesised by precipitation polymerisation to be used as sorbent in a MISPE procedure for urinary PAH metabolites. Once the MISPE parameters were optimised, the procedure was validated using spiked human urine samples according to real values analysed in biomonitoring assays. Recent human biomonitoring studies have provided around $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of 1-OHP in urine of Spanish adult population, lower than other values obtained from other European Countries [46].

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions

Standards of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in crystalline solid and in acetonitrile solution (at a concentration of $10 \mu\text{g L}^{-1}$), and hydroxyphenanthrene (OHPHE) isomer standards (1-OHPHE, 2-OHPHE, 3-OHPHE and 4-OHPHE) at a concentration of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ were purchased from Dr. Ehrenstofer (Germany). Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and methacrylic acid (MAA) were obtained from Sigma-Aldrich (Spain). 2,2-azo(bis)-isobutyronitrile

(AIBN) and dichloromethane (DCM) were obtained from Fluka (Switzerland). HPLC-grade solvents used were acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH), these were purchased from Scharlau (Spain). Ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ quality) was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Spain) and used for all dilutions. All other reagents used were of analytical grade or better.

Crystalline solid of 1-OHP was used for the preparation of MIP and the standard solution in ACN was used for preparation of working solutions. The working solutions of 1-OHP were prepared daily in acetonitrile. In cross-selectivity experiments, OHPHE isomers were used and working solutions of them were prepared daily in acetonitrile by appropriate dilution of standard solutions purchased.

All solutions were stored in amber-coloured flasks to prevent photodegradation.

2.2. Samples

PAHs free urine samples were collected from healthy newborns and stored without preservatives at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until use. Before processing, samples were allowed to thaw at room temperature and then homogenised by gently shaking. The biological fluid was directly injected into the chromatographic system after only filtration using Whatman PPW/GMF polypropylene filters ($0.45 \mu\text{m}$).

The working standard solutions were used to spike the PAHs free urine to cover calibration range $0.15\text{--}2.00 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.3. Instrumentation and chromatographic conditions

Chromatographic analysis was performed on an Agilent 1230 Infinity HPLC coupled to a Hewlett Packard 1046A luminescence detector, operated with Chemstation for LC Agilent system. Samples were manually injected using a $20 \mu\text{L}$ injector loop.

The stationary phase was a Zorbax Eclipse PAH ($150 \times 4.6 \text{ mm}^2$, $3.5 \mu\text{m}$) linked to a security guard cartridge Salva Eclipse PAH ($12.5 \times 4.6 \text{ mm}^2$, $5 \mu\text{m}$) from Agilent Technologies (Spain). The chromatographic separation was carried out at constant temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). The mobile phase used was a mixture of methanol and water (88:12) pumped at a flow-rate of 1 mL min^{-1} in isocratic mode. Excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were fixed at 242 and 388 nm, respectively. The chromatographic procedure was optimised to analyse 1-OHP and OHPHE isomers.

2.4. Synthesis of molecularly imprinted polymers

MIP was synthesised using 10 mg 1-OHP as a template, MAA ($23.3 \mu\text{L}$) as functional monomer, EGDMA ($350 \mu\text{L}$) as crosslinker, AIBN (79.7 mg) as polymerisation reaction initiator and ACN (8.95 mL) as porogen.

The polymerisation was carried out in a 35 mL glass vial, and a molar ratio of 1:6:40 (template/MAA/EGDMA) was maintained in excess of AIBN. The molar relation 1:24 between template-porogen allowed the preparation of imprinted beads. Polymerisation was carried out under high dilution conditions, in order to synthesise uniform crosslinked polymer microspheres [47]. The total solution was purged with nitrogen and sonicated during 10 min in an ultrasonic bath (Selecta Ultrasons, Spain).

The polymerisation process was thermally initiated and maintained at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for a period of 24 h into a thermostated bath with magnetic stirring at 100 rpm. Afterwards, the polymer particles were collected by centrifugation and the template and unreacted chemicals were removed with methanol in a Soxhlet extractor. A nylon mesh of $25 \mu\text{m}$ (Safer NYTAL, Switzerland) was used to hold

the polymer particles in the Soxhlet paper thimble. This washing procedure was repeated until the template was not detected in washing solutions by fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 242$, $\lambda_{\text{em}} = 388$). Finally, the polymer particles were dried at 60 °C in a hot air oven and stored at room temperature for further MISPE procedure.

Non-imprinted polymer (NIP) was prepared and processed in the same manner as the imprinted polymer but in the absence of template (1-OHP).

2.5. Morphological observation

The morphology of polymers was examined by scanning electron microscopy (SEM, S-3000N, Hitachi, Japan). SEM image was made by the dispersion method. In this procedure, polymer was prepared putting about 10 mg of polymer in 4 mL of ethanol (96%) and then, this solution was sonicated for 30 s in ultrasonic bath to break up conglomerates. A slide glass was wet with 3 small drops of diluted particle dispersion. Before scanning electron microscopy experiments, the dried specimen was coated under vacuum with a thin layer of Au/Pd (Polaron Range SC7620).

2.6. MISPE cartridge preparation and extraction conditions

MISPE cartridge was prepared packing the resulting microspheres polymer (125.8 mg) into an empty SPE polypropylene cartridge of 1 mL between two frits with 20 μm pore size (Agilent Technologies). Similar procedure was used to prepare NIP-SPE cartridge. Before conditioning, cartridges were washed and dried. A vacuum SPE manifold system (Varian Technologies, USA) with vacuum control press-pump (Selecta, Spain) was used in SPE procedure.

For optimum conditions, the MISPE cartridge was conditioning with 800 μL of acetonitrile, and loading with 200 μL of a 1-OHP standard solution (0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$) in acetonitrile. Washing step was carried out using 100 μL of ACN/water (95:5, v:v). The analyte retained in the cartridge was eluted using 4 \times 100 μL of methanol/dichloromethane (85:15, v:v). Solutions were added to the cartridge and then allowed to pass through the column under vacuum conditions. Both the washing and elution fractions were collected and dried under a gentle nitrogen stream at room temperature. The residues were reconstituted with the adequate volume of acetonitrile previous HPLC–FD analysis.

3. Results and discussion

3.1. MISPE preparation and procedure optimisation

The 1-OHP MIP with a homogeneous binding site distribution has been prepared by precipitation to obtain a suitable MISPE for selective extraction of this PAH biomarker. In a crosslinking copolymerisation, increasing the amount of solvent gradually causes growing polymer chains unable to occupy the entire volume of the vessel, and therefore formation of a dispersion of macrogel particles. Additional dilution would lead to a decrease in the size of the gel particles. At infinite dilution, macromolecules consisting of intramolecularly crosslinked chains (microgels) would be formed [47,48]. In this work, MIP was synthesised with a molar ratio of 1:6:40 (template/MAA/EGDMA) in order to obtain a high degree of crosslinking and adequate dilution in the polymer matrix to produce specific cavities and to maintain the imprinted memory. MAA was chosen as functional monomer due to its widely and recognised ability to form hydrogen bonds, and an aprotic and apolar porogen as acetonitrile was used. Porogen not only plays an important role in the polymer morphology, but also

affects the ionic interactions and hydrogen bonds between target and the functional monomer.

The corresponding blank or non-imprinted polymer was prepared under the same conditions without the use of template to act as control.

Fig. 1 presents the SEM microscopic image of the precipitation MIP characterized by nano-sized globular particles.

MISPE optimisation is not different from other SPE procedures and the common steps of conditioning, sample loading, washing and elution have to be carried out. In this study, volume and concentration of sample, loading, washing and elution solvents and volumes were optimised.

Before the sample loading, cartridge was conditioned with 800 μL of ACN. The loading solvent was chosen in order to allow rebinding of the analyte to specific sites, whereas the elution solvent has to be optimised according to its ability to disrupt the analyte–polymer interaction. According to the literature, the solvent used as porogen during polymerisation was chosen as loading solvent. Then, different concentrations of 1-OHP (0.15 to 2.00 $\mu\text{g L}^{-1}$) in acetonitrile were prepared to assess loading concentration. In this concentration range, results obtained did not show significant difference in the recovery. According to these results and human biomonitoring studies [5], the concentration of 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ was chosen as working concentration. Loading was carried out maintaining sample onto the cartridge during 5 min and then it was passed through the column under vacuum conditions. Subsequently, different sample volumes (50–500 μL) were tested to evaluate the

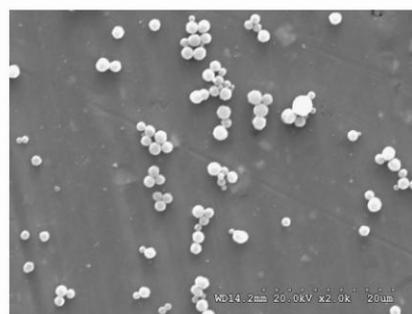


Fig. 1. SEM microscopic image of the MIP particles obtained by precipitation synthesis.

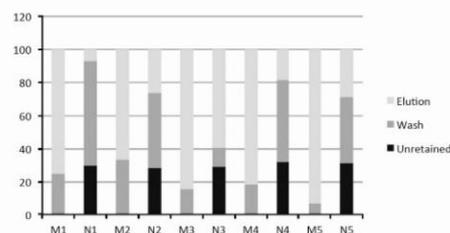


Fig. 2. Percentage of 1-OHP recovered from different solvents used to wash from the imprinted (M) and non-imprinted (N) SPE material; the numbers in the x-axis labels correspond to the different solvents: (1) ACN:MeOH 50:50, (2) ACN:MeOH 80:20, (3) water, (4) acetonitrile, and (5) acetonitrile:water 95:5. The amount of 1-OHP in the unretained fraction is in black, eluted fraction by the wash solvent is in grey, and the eluted fraction is in light grey. In non-imprinted experiment, the eluted percentages could not be detected and were calculated by difference.

loading. The retained amount of 1-OHP was evaluated and calculated as the difference between 1-OHP total amounts loaded onto the cartridge initially, and collected 1-OHP in the fractions from the loading and washing steps. In each process, the obtained extracts were injected into HPLC-FLD system to evaluate the best procedure.

Before the elution, washing step was carried out in order to remove the interfering compounds non-specifically retained. The presence of non-specific binding sites is attributed to the high amount of monomer used during MIP synthesis by the non-covalent approach. In this step, different washing solvents and volumes were investigated in this study: water, acetonitrile, methanol and mixtures of them. The recoveries of 1-OHP obtained when 200 μL of 1-OHP solution of $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN was loaded are shown in Fig. 2. In the figure, the SPE set-up containing the imprinted material is labelled M and the set-up with the non-imprinted material is labelled N. The number succeeding these letters identifies the washing solvents used: (1) ACN:MeOH 50:50, (2) ACN:MeOH 80:20, (3) water, (4) ACN, and (5) ACN:water 95:5.

The different recoveries obtained for NIP and MIP indicated that the interactions between the template and MIP were specific. The analysis of fractions collected from the washing step showed that 1-OHP was highly retained by the polymer when the washing solvent used was ACN:water (95:5, v:v). Washing volume was also optimised and a volume of 100 μL of mixture ACN:water (95:5) was used as optimum washing conditions.

Ensuring complete elution of the adsorbed analyte from MISPE procedure is necessary to find out the appropriate solvent. Consequently, the efficacy of various polar solvents for the elution of 1-OHP was evaluated. The solvents tested were MeOH and mixtures of MeOH:DCM, MeOH:ACN and ACN:water in different proportions. Fig. 3 shows the elution efficacy in terms of recoveries for some solvents and mixtures. The best recovery (82%) was obtained using a mixture of polar protic solvent (MeOH) and polar aprotic solvent (DCM) in 85:15 proportions. These results suggest that 1-OHP was bound to the binding sites through hydrogen bonds and ionic interactions which were affected and altered by polar solvents allowing the rapid desorption of the analyte. Different volumes of elution have also been tested. These studies revealed that the optimum volume of elution was 400 μL ($4 \times 100 \mu\text{L}$).

The optimised procedure was applied to urine samples free of PAHs spiked with the working standard solutions at different levels of concentrations ($0.15 \mu\text{g L}^{-1}$, $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ and $2.00 \mu\text{g L}^{-1}$).

Elution recoveries obtained from 1-OHP under the optimised MISPE conditions described above were of 83%. The same procedure was applied for the NIP and the analyte was not detected in the obtained eluate. Fig. 4 compares chromatograms of spiked urine samples (a) without MISPE clean-up, and (b) extract obtained by MISPE procedure.

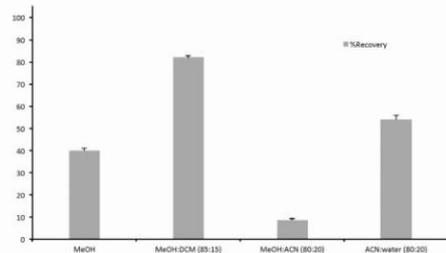


Fig. 3. Recovery percentage of 1-OHP after elution with $4 \times 100 \mu\text{L}$ of different elution solvents. Error bars indicate the standard deviation of replicates ($n=3$).

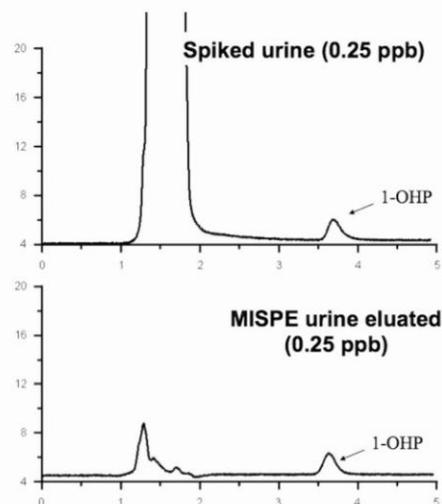


Fig. 4. Chromatograms of spiked urine samples (a) without MISPE clean-up and (b) extract obtained by MISPE procedure.

3.2. Selectivity of MIP

The complete confirmation of the imprinting performance involves the study of the selectivity of the MIPs. This was accomplished by determination of binding capacity of MIP in the presence of other structural analogues of the 1-OHP as hydroxyphenanthrene isomers, shown in Fig. 5.

We have chosen phenanthrene metabolites because they have also received great interest in biological monitoring of PAH. Although urinary concentrations of monohydroxyphenanthrene metabolites are less sensitive to assess smoker exposure than 1-OHP, they are better for assessing exposures where the biomonitoring study comprises smokers and non-smokers or the specific inhalation exposure to phenanthrene [7]. On the other hand, the PAH rich diet causes elevated excretion of phenanthrene metabolites in urine, while only minor increases of them have been found in smokers when compared to non-smokers. Consequently, in a number of studies, phenanthrene metabolites have been utilised for biological monitoring of PAH diet [7].

MISPE procedure was assessed mixing each of OHPHE isomers and 1-OHP due to chromatographic co-elution of some OHPHE isomers [37]. For the interference study, mixtures of $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte were prepared with purchased standard solutions ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN). The optimised procedure described was used to evaluate each of these mixtures. The analytes were retained completely into cartridge and Fig. 6 shows the comparative results obtained in washing and elution steps. The MIP exhibited higher specific binding for 1-OHP than for the isomers tested, due to the presence of imprinting cavities with fixed size, shape and stereochemistry for 1-OHP molecules. However, the presence of the hydroxyl group in the 1-position resulted in considerably higher crossbinding in the sites and competitiveness of 1-OHP and 1-OHPHE was clearly demonstrated in the presence of 1-OHP in the washing step. Consequently, the absence of the hydroxyl group in this position (other hydroxyphenanthrene isomers) resulted in a major binding difference and 1-OHP was not found in the washing step. In addition, smaller size of OHPHE isomers than 1-OHP,

4. Conclusion

In this research, a molecularly imprinted polymer against 1-OHP was synthesised using a precipitation strategy and applied as selective sorbent in SPE for the treatment of human urine samples prior to analysis. A novel MISPE–HPLC–FLD method for determination of 1-OHP was established. The results indicate that the proposed method offers high recoveries, low detection limit and good repeatability, providing a specific, reliable and alternative method to determine 1-OHP in human urine samples.

Acknowledgements

Authors thank Department of Mathematical Physics and Fluids, Faculty of Sciences, National University of Distance Education (UNED), for the SEM studies and the Comunidad Autónoma of Madrid and European funding from FEDER (Fonds Européen de Développement Économique et Régional) programme (Project S2013/ABI-3028, AVANSECAL).

References

- [1] European Comision-Scientific Committee on Food, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons—Occurrence in Foods, Dietary Exposure and Health Effects, European Commission, Brussels, 2002.
- [2] ATSDR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, ATSDR, Atlanta, 1995.
- [3] IARC, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, World Health Organization, Lyon, 2010.
- [4] J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 201–228.
- [5] K. Desmet, B. Tienpont, P. Sandra, *Chromatographia* 57 (2003) 681–685.
- [6] F.J. Jongeneelen, R.B.M. Anzion, P.T. Henderson, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 413 (1987) 227–232.
- [7] R. Jacob, A. Seidel, *J. Chromatogr. B* 778 (2002) 31–47.
- [8] F. Onyemauwa, S.M. Rappaport, J.R. Sobus, D. Gajdosova, Ra Wu, S. Waidyanatha, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1117–1125.
- [9] Y. Wang, W.B. Zhang, Y.L. Dong, R.F. Fan, G.Y. Sheng, J.M. Fu, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 804–809.
- [10] T. Chetivanukornkul, A. Toriba, T. Kameda, N. Tang, K. Hayakawa, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 712–718.
- [11] F.J. Jongeneelen, *Toxicol. Lett.* 72 (1994) 205–211.
- [12] Health Canada, Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada, Health Canada, Ottawa, 2013.
- [13] C. Viau, A. Diakite, A. Ruzgite, B. Tuchweber, C. Blais, M. Bouchard, *A. Vysokocil, J. Chromatogr. B* 778 (2002) 165–177.
- [14] A.M. Hansen, L. Mathiesen, M. Pedersen, L.E. Knudsen, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211 (2008) 471–503.
- [15] E. Siwinska, D. Mielzynska, E. Smolik, A. Bubak, J. Kwapiulinski, *Sci. Total Environ.* 217 (1998) 175–183.
- [16] A. Roda, P. Simoni, M. Mirasoli, M. Baraldini, F.S. Violante, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 751–758.
- [17] W.L. Huang, C.J. Smith, C.J. Walcott, J. Grainger, D.G. Patterson, *Polycycl. Aromat. Compd.* 22 (2002) 339–351.
- [18] J. Grainger, W.L. Huang, Z. Li, S. Edwards, C. Walcott, C. Smith, W. Turner, R. Wang, D.G. Patterson, *Polycycl. Aromat. Compd.* 25 (2005) 47–65.
- [19] L.C. Romanoff, Z. Li, K.J. Young, N.C. Blakely, D.G. Patterson, C.D. Sandau, *J. Chromatogr. B* 835 (2006) 47–54.
- [20] L.C. Andre Amorim, J.-M. Dimandja, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2900–2904.
- [21] R.F. Fan, Y.L. Dong, W.B. Zhang, Y. Wang, Z.Q. Yu, G.Y. Sheng, J.M. Fu, *J. Chromatogr. B* 836 (2006) 92–97.
- [22] S. Sen, S.L. Gelhaus, I.A. Blair, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 2440–2441.
- [23] B. Ramsauer, K. Sterz, H.-W. Hagedorn, J. Engl, G. Scherer, M. McEwan, G. Errington, J. Shepperd, F. Cheung, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 877–889.
- [24] A.M.B. Giessing, L.M. Mayer, T.L. Forbes, *Mar. Environ. Res.* 56 (2003) 599–615.
- [25] M. Lototte, R. Belfutni, P.F. de Violet, P. Garrigues, M. Lafontaine, C. Dumas, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 816–821.
- [26] K. Vatsavai, H.C. Goicoechea, A.D. Campiglia, *Anal. Biochem.* 376 (2008) 213–220.
- [27] H.M. Yang, Y.S. Wang, J.H. Li, G.R. Li, Y. Wang, X. Tan, J.H. Xue, X.L. Xiao, R.H. Kang, *Anal. Chim. Acta* 636 (2009) 51–57.
- [28] D. Barbeau, A. Maitre, M. Marques, *Analyst* 136 (2011) 1183–1191.
- [29] Q. Miao, M. Bouchard, D. Chen, I. Burstyn, J.J. Spinelli, K.J. Aronson, *Sci. Total Environ.* 470–471 (2014) 945–953.
- [30] L. Ramos, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84–98.
- [31] Z. Huang, H.K. Lee, *TrAC Trends* 39 (2012) 228–244.
- [32] L. Campo, F. Rossella, S. Fustinoni, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 531–540.
- [33] W. Huang, J. Ding, Y.-Q. Feng, *Chin. J. Anal. Chem.* 40 (2012) 830–834.
- [34] C.K. Lee, S.H. Cho, J.W. Kang, S.J. Lee, Y.S. Ju, J.H. Sung, P.T. Strickland, D.H. Kang, *Toxicol. Lett.* 108 (1999) 209–215.
- [35] M. Matarozzi, M. Musci, M. Careri, A. Mangia, S. Fustinoni, L. Campo, F. Bianchi, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5634–5639.
- [36] C.J. Smith, C.J. Walcott, W.L. Huang, V. Maggio, J. Grainger, D.G. Patterson, *J. Chromatogr. B* 778 (2002) 157–164.
- [37] G. Zhao, Y.S. Chen, S. Wang, J.J. Yu, X.Y. Wang, F.W. Xie, H.M. Liu, J.P. Xie, *Talanta* 116 (2013) 822–826.
- [38] K.-S. Boos, J. Lintelmann, A. Ketrup, *J. Chromatogr. A* 600 (1992) 189–194.
- [39] A. Martin-Esteban, *TrAC Trends* 45 (2013) 169–181.
- [40] Y. Hu, J. Pan, K. Zhang, H. Lian, G. Li, *TrAC* 43 (2013) 37–52.
- [41] F.G. Tamayo, E. Turiel, A. Martin-Esteban, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 32–40.
- [42] X. Song, J. Li, S. Xu, R. Ying, J. Ma, C. Liao, D. Liu, J. Yu, L. Chen, *Talanta* 99 (2012) 75–82.
- [43] J. Xie, C. Cai, S. Lai, L. Yang, L. Luo, H. Yang, Y. Chen, X. Chen, *React. Funct. Polym.* 73 (2013) 1606–1611.
- [44] O. Balltrons, M. Lopez-Mesas, C. Palet, F. Le Derf, F. Portet-Koltala, *Anal. Methods* 5 (2013) 6297–6305.
- [45] J.J. Olmos-Espejel, M.P. Garcia de Llasera, M. Velasco-Cruz, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 138–147.
- [46] M. Bartolome, J.J. Ramos, F. Cutanda, O. Huetos, M. Esteban, M. Ruiz-Moraga, E. Calvo, B. Pérez-Gómez, O. González, A. Castaño, *Chemosphere* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.008>.
- [47] L. Ye, K. Mosbach, *React. Funct. Polym.* 48 (2001) 149–157.
- [48] W. Funke, O. Okay, B. Joos-Müller, in: S. DiMarì, W. Funke, et al., (Eds.), *Microencapsulation-Microgels-Iniferfers*, Springer, Heidelberg, Berlin, 1998, pp. 139–234.

A manuscript number has been assigned: TAL-D-15-02781

12/11/15 10:43

De: "TALANTA" <editorsupport@elsevier.com>
Asunto: A manuscript number has been assigned: TAL-D-15-02781
Fecha: Mie, 30 de Septiembre de 2015, 11:44 am
Para: agallego@ccia.uned.es

Ms. Ref. No.: TAL-D-15-02781
Title: ON-LINE FLOW INJECTION MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION FOR THE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF 1-HYDROXYPYRENE IN URINE SAMPLES
Talanta

Dear Dr. Alejandrina Gallego Picó,

Your submission entitled "ON-LINE FLOW INJECTION MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION FOR THE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF 1-HYDROXYPYRENE IN URINE SAMPLES" has been assigned the following manuscript number: TAL-D-15-02781.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tal/>.

Your username is: agallego@ccia.uned.es
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/tal/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Administrative Support Agent
Administrative Support Agent [03-Feb-15]
Talanta

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ABSTRACT

New analytical strategies tend to automation of sample pre-treatment and flow analysis techniques provided a number of enhanced analytical methods allowing high throughput. Flow techniques are usually faster, more robust and more flexible than their batch equivalents. In addition, flow methods use less sample and reagent amounts and reduce analytical costs and waste.

A flow injection solid-phase extraction pre-concentration system using a molecularly imprinted polymer (MIP) packed micro-column was developed for the determination of 1-hydroxypyrene in human urine with fluorescence detection. The pre-concentration of 1-hydroxypyrene on the MIP was carried out based on the specific retention of analyte by on-line introducing the sample into the micro-column system. Methanol and dichloromethane mixture was used to elute the retained analyte for fluorometric analysis. Important influencing factors were studied in detail, in batch and in flow (MISPE procedure optimisation, sample and eluent volumes, flow rate, dimensions of MIP micro-column and amounts of packing material, etc).

To the best of our knowledge, this is the first on-line flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the pre-concentration and determination of hydroxylated PAH metabolite in urine samples. The optimised method was successfully applied to the determination of 1-Hydroxypyrene in spiked urine samples, with recoveries in the range of 74-85% and RSD < 4.6 %. Under optimum experimental conditions, the linearity concentration range used was 10-400 $\mu\text{g L}^{-1}$, $R^2 > 0.996$. We obtained limit of detection and quantification of 3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 10.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

KEYWORDS:

1-Hydroxypyrene; on-line solid-phase extraction; molecularly imprinted polymer; human urine; flow injection analysis

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are important environmental and dietary pollutants [1, 2] with carcinogenic and mutagenic potential [3]. Usually, biomonitoring of PAHs exposure is based on the measurement of urinary hydroxylated metabolites (OH-PAHs) and several biomarkers have been proposed [4-7]. However, 1-hydroxypyrene (1-OHP) is commonly used as a biological indicator of

exposure to PAHs in environmental and occupational health studies [8-10]. In the last years, many analytical methods have been published for determination of 1-OHP and other PAH metabolites. Different chromatography methods coupled to mass spectrometry [11-16] or liquid chromatography with fluorescence detection [6, 7, 9, 17] have been mainly used for determination of these compounds. However, liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD) is extensively employed for determination of 1-OHP in most routine laboratories, since it is a cheap and simple technique, in comparison to others and it is as sensitive as other methods. Nevertheless the most important challenge in the analysis of OH-PAHs and other trace contaminants is the extraction and isolation of analytes from complex matrices, thus new selective methods are required [18, 19]. On the other hand, the new analytical strategies tend to automation of sample pre-treatment and flow-analysis techniques provided a number of enhanced analytical methods allowing high throughput [11, 20, 21].

Consequently, several pre-treatment methodologies have been proposed to improve the sensitivity and specificity in the OH-PAHs determination. Solid-phase extraction (SPE) with different types of sorbents [7, 14, 16, 22-24] immunoextraction [25], solid phase microextraction (SPME) [26, 27], stir bar sorptive extraction (SBSE) [28, 29] and liquid-liquid extraction (LLE) [13, 16] have been used in the developed methods. Fluorometric analysis on solid sorbent elements has been also proposed [30] and other pre-treatment systems have been studied [31]. In response to the need for automation sample pre-treatment, some procedures were developed for PAHs analysis [32-37] however few procedures were applied to OH-PAHs determinations. Column-switching systems coupled to HPLC were used for determining monohydroxy [a] benzopyrene isomers [38] or 1-OHP [39]. In other studies, automated off-line solid phase extraction were developed for 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation [17, 40] and a RapidTrace SPE system was optimised for measuring 23 urinary PAH metabolites [11].

Following these trends, we have developed a flow injection solid-phase extraction for the pre-concentration and determination of 1-OHP in urine samples, using a molecularly imprinted polymer (MIP) as sorbent material. Compared with traditional sorbents, MIPs are much more effective and have been successfully applied to the isolation and pre-

concentration of analytes in complex samples in the last years [41, 42]. On the other hand, flow techniques are usually faster, more robust and more flexible than their batch equivalents [20], using less sample and reagent amounts and reducing analytical costs and wastes.

In this work, an 1-OHP molecularly imprinted polymer and a flow injection solid-phase extraction pre-concentration system using MIP packed micro-column was developed for the determination of 1-OHP in human urine with fluorescence detection. The pre-concentration of analyte on the MIP was carried out based on the specific retention of 1-OHP by on-line introducing the sample into the micro-column system. Important influencing factors were studied in detail, in batch and in flow system (MISPE procedure optimisation, sample and eluent volumes, flow rate, dimensions of MIP micro-column and amounts of packing material, etc). This method was validated in spiked blank urine collected from healthy newborns.

2. Material and methods

2.1. Reagents and instruments

Standards of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in crystalline solid and in acetonitrile solution (at a concentration of $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) were purchased from Dr. Ehrenstofer (Germany). Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and methacrylic acid (MAA) were obtained from Sigma-Aldrich (Spain). 2,2-azo(bis)-isobutyronitrile (AIBN) and dichloromethane (DCM) were obtained from Fluka (Switzerland). HPLC-grade solvents used were acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH), these were purchased from Scharlau (Spain). Ultra pure water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ quality) was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Spain) and used for all dilutions. All other reagents used were of analytical grade or better.

Crystalline solid of 1-OHP was used for the preparation of MIP and the standard solutions in ACN was used for preparation of working solutions. The working solutions of 1-OHP were prepared daily in acetonitrile. All solutions were stored in amber-coloured flasks to prevent photodegradation.

Fluorescence intensity was measured using a model LS-50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK). Instrumental parameters and processing data were controlled by FL Winlab software. The excitation and emission wavelengths were set at 242 nm and 388 nm respectively. A

Perimax peristaltic pump (Spetec, Erding, Germany), a six ways injection valve (Omnifit, Cambridge, UK) with a 250 μL sampling loop, and a 100 μL quartz flow-through cell (Hellma 176.051-QS) in the sample compartment of the spectrofluorometer, were used to set-up the FIA manifold. A 1.8 cm long, 0.8 mm i.d. PTFE column filled with MIP was connected to the FI system.

An ETHOS SEL microwave oven (Milestone, Sorisole, Italy) was used to remove the template from the imprinted polymer. Instrumental parameters were controlled by MLS-easy WAVE-combiCHEM 3.5.2.0 software.

In adsorption and batch experiments, an Agilent 1230 Infinity HPLC coupled to a Hewlett Packard 1046A luminescence detector was used.

2.2. Samples

PAHs free urine samples were collected from healthy newborns and stored without preservatives at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until use. Before processing, samples were allowed to thaw at room temperature and then homogenised by gently shaking.

The biological fluid was directly injected into the FIA system after only filtration using Whatman PPW/GMF polypropylene filters ($0.45 \mu\text{m}$).

The working standard solutions were used to spike the PAHs free urine to cover calibration range: 10 to $400 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.3. Synthesis of molecularly imprinted polymer

MIP was synthesised using a classical bulk polymerisation strategy. 10 mg of crystalline 1-OHP were used as template, 23.3 μL of MAA as functional monomer, 350 μL of EGDMA as crosslinker, 79.7 mg of AIBN as polymerisation reaction initiator and ACN (0.622 mL) as porogen. The template, functional monomer and crosslinker ratio chosen was 1:6:40. The total solution was purged with nitrogen and sonicated during 10 minutes in an ultrasonic bath (Selecta Ultrasons, Spain). The polymerisation was started at room temperature and subsequently, the polymerisation mixture was transferred to a thermostated bath set at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for a period of 24 h. Afterwards the polymer obtained was maintained at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in an oven for 24 h to complete the cure of the polymer.

The MIP monolith was crushed, mechanically ground, and wet-sieved using methanol to

deliver polymer particulates. In this work, the sieved selected fraction was larger than 50 μm and less than 100 μm .

Non-imprinted polymer (NIP) was prepared and processed in the same manner as the imprinted polymer but in the absence of template (1-OHP).

2.4. Template extraction

A critical phase in the MIP preparation is the extraction of the template from the MIP. Usually the template was removed from the MIP by Soxhlet extraction with methanol until 1-OHP was not detected in the washing solution by fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=242$, $\lambda_{\text{em}}=388$). In the present work, the template underwent microwave-assisted extraction (MAE) with the aim of reducing this time and increasing extraction efficiency. Standard MAE conditions were as follows: MIP and 30 mL of methanol were placed in the extraction vessels and exposed to MAE over a 5 min heating ramp period up to 100 $^{\circ}\text{C}$. This temperature was then maintained for 20 min. After extraction, the vessel content was transferred to a vacuum filtration system for removal of the solvent. This process was performed three times in order to ensure the total extraction of the template and washing solutions were kept for posterior extraction efficiency studies. Finally, the polymer particles were dried at 60 $^{\circ}\text{C}$ in a hot air oven and stored at room temperature prior to use. Non-imprinted polymer (NIP) was also extracted in the same method.

2.5. Batch mode binding experiment

An adsorption experiment was carried out to study binding properties of MIP and NIP. In this batch experiment 20 mg of MIP or NIP were added to 2.5 mL of solution of 1-OHP with various concentrations ranging from 0.5 to 60 mg L^{-1} . The mixture was incubated for 24 h at room temperature stirring at 450 rpm. The supernatants and polymer were isolated by centrifugation and filtration (0.45 μm). The concentration of unbound 1-OHP in the supernatant was analysed by HPLC-FD [24]. All the model parameters were evaluated by both non-linear regression and linear least-squares method using OriginPro v. 8.0 software of OriginLab Corp. (Northampton, U.K.).

2.6. Flow injection system and procedure

The manifold used in this study is shown in Fig. 1. The micro-column of the system was

prepared with 11.3 mg of dried MIP packed in a 1.8 cm long, 0.8 mm i.d. PTFE with the aid of a syringe. In the FI system, the flow stream was generated by a peristaltic pump and the samples were introduced by a six-way rotary valve provided with a 250 μL sample loop. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) connected carrier reservoir, valve, micro-column and the flow-through cell in the compartment of the spectrofluorometer.

The optimisation procedure started by flowing the carrier solution (ACN) at a flow rate of 1 mL min^{-1} through the MIP micro-column until a stable baseline signal was achieved. At this moment, 250 μL of sample were injected in the FI system through the injection valve and MIP retained the analyte in the micro-column. Washing step was carried out using as carrier solution a mixture of ACN/water (95:5, v:v). The eluent solution, MeOH/DCM (85:15, v:v), was then passed through the column to remove the adsorbed 1-OHP. The relative intensity of fluorescence was measured continuously using selected wavelength ($\lambda_{\text{ex}}=242$, $\lambda_{\text{em}}=388$) and slit width of 2.5 for excitation and emission. The detected peak due to the passage of the analyte through the flow cell was recorded and quantified. When the fluorescence signal returned to the baseline value, the system was ready for the next determination.

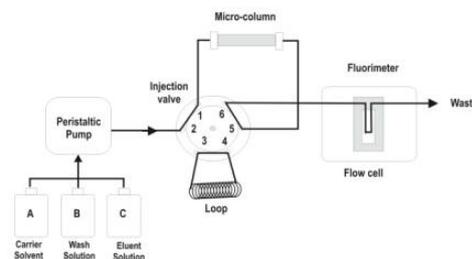


Fig. 1. Flow injection system for determining 1-OHP.

3. Results and discussion

3.1. MIP preparation and extraction of the template

Depending on the polymerisation method used, MIPs can have various physical configurations and the volume of porogen plays an important role in the polymer morphology. However, It has been found that the crushed bulk polymer with irregularly shaped particles, and the precipitation polymer agglomerates prepared by polymerisation have similar micro-structure

[43] and similar binding site are obtained for selective extraction of analyte. In this work, MIP was synthesised with a molar ratio of 1:6:40 (template/MAA/EGDMA) and a molar ratio of 3:5 between template-porogen allowed the polymerisation with a bulk strategy [24]. Theoretically, the imprinting template-memory mainly depends on the interaction between the template and the functional monomer and consequently, MAA was chosen as functional monomer due to its widely and recognised ability to form hydrogen bonds, and the weakly polar acetonitrile was chosen as porogen because strongly polar solvents could counteract the formation of affinity bonds for template. The particle size was between 50 μm and 100 μm . The particle size was chosen for the best use of the FI system. Particles < 50 μm produced an overpressure on the system, while those 100 μm led to broad fluorescence peaks. Additionally, the step for removing the imprinted 1-OHP was improved using microwave-assisted extraction (MAE). The effectiveness of the extraction was evaluated by fluorometric analysis of the washing solutions containing the extracted template collected after the successive MAE extractions. Extraction results showed that the complete removal of the template from the MIP to occur during the first extraction and successive extractions are consequently unnecessary. This procedure reduces the time required for achieving efficient extraction of the template in the routine post-treatment step with imprinted polymers.

3.2. Binding properties and adsorption isotherms

The adsorption capacity value (Q , mg g^{-1}) was evaluated from the difference of the initial and the measured free 1-OHP concentrations in the supernatant by Eq. (1):

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \cdot v}{w} \quad (1)$$

where C_0 and C_e are the initial and equilibrium adsorption concentrations of the analyte, respectively, v is the volume of the solution and w is the mass of polymer. The maximum adsorption capacity of the MIP particles was 2.14 mg g^{-1} that was higher than that of the NIP particles (0.85 mg g^{-1}). This corresponds to specific interactions between the template and the residual of functional monomer in the MIP. Non-specific rebinding in the NIP is due to hydrogen bonds, electrostatic interactions and van der Waals forces between the

template and the residual functional groups in the polymer. Fig. 2 shows the experimental adsorption data of MIP and NIP synthesised for 1-OHP.

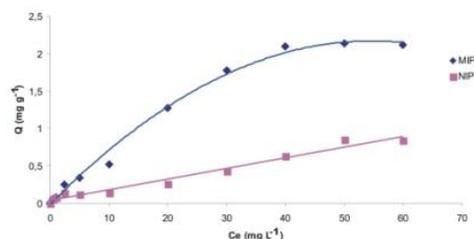


Fig. 2. Experimental adsorption data of the MIP and NIP for 1-OHP.

For evaluation of the imprinting ability, the imprinting factor (IF) was calculated and the value was 2.5. IF is defined as the Eq. (2):

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (2)$$

where Q_{MIP} and Q_{NIP} are the adsorption capacity of MIP and NIP to 1-OHP, respectively. Imprinting factor is a measure of the strength of interaction of the imprinted polymer towards the template molecule and it has been shown that there was a positive correlation of the interaction strength with the imprinting factor, meaning that imprinted polymers exhibiting good performance, in terms of high imprinting factor value, should interact strongly with the template molecule and therefore afford greater retention in relation to the non-imprinted polymer [44].

Many isotherms model have been reported in literature to successfully calculate the binding properties of MIPs [45] but several two-parameter isotherm models are commonly used in modeling the adsorption data, such as Langmuir or Freundlich. Modeling the adsorption isotherm data is an essential way for predicting and comparing the adsorption performance. In this work, Langmuir and Freundlich isotherm models were used to analyse the adsorption data of MIP.

The linear form of the Langmuir isotherm expression is represented by the Eq. (3):

$$\frac{1}{Q} = \left[\frac{1}{Q_{\max} K_L} \right] \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_{\max}} \quad (3)$$

where C_e is the concentration of solution at

equilibrium (mg L^{-1}), Q is the corresponding adsorption capacity (mg g^{-1}), Q_{max} (mg g^{-1}) and K_L (L mg^{-1}) are constants which are related to adsorption capacity and energy or net enthalpy of adsorption, respectively. Langmuir isotherm model is a model that describes monolayer adsorption based on the assumption that all the adsorption sites have equal template affinity and that adsorption at

one site does not affect adsorption at an adjacent site.

The standard errors (S.E.) for each parameter were used to measure the goodness-of-fit. Apart from S.E., the correlation coefficient (R^2) was also used to determine the best-fitting isotherm to the experimental data (Table 1).

Table 1. Langmuir and Freundlich isotherm parameters obtained by non-linear fitting for MIP and NIP polymers.

Model	Parameters	MIP		NIP	
		Value	S.E.	Value	S.E.
Langmuir	$a=1/Q_{\text{max}}$	0.760	0.467	3.383	0.885
	$b=1/(K_L Q_{\text{max}})$	8.313	0.647	7.021	1.225
	R^2	0.948	-	0.779	-
Freundlich	$a=\log K_F$	-0.997	0.038	-1.141	0.080
	$b=1/n$	0.794	0.023	0.539	0.066
	R^2	0.985	-	0.876	-

The Q_{max} and K_L values for MIP were 1.32 mg g^{-1} and 0.09 L mg^{-1} , respectively with $R^2 = 0.948$. NIP values were 0.30 mg g^{-1} and 0.48 L mg^{-1} for Q_{max} and K_L , and $R^2=0.799$. These clearly show that the MIP values of Q_{max} was higher than NIP, and Langmuir model fit satisfactory MIP adsorption data.

On the other hand, the Freundlich isotherm is introduced as an empirical model, where Q represents the amount adsorbed per amount of adsorbent at the equilibrium, C_e represents the equilibrium concentration, and K_F and n are parameters that depend on the adsorbate and adsorbent.

The linear form of the Freundlich isotherm expression is represented by the Eq. (4):

$$\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (4)$$

where K_F and n are Freundlich constants which correspond to adsorption capacity and adsorption intensity, respectively. For MIP, the obtained values were 0.100 for K_F and 1.26 for n with $R^2 = 0.985$. The K_F and n values for NIP were 0.072 and 1.85, respectively with $R^2 = 0.876$. Freundlich isotherm model considers heterogeneous surfaces and is based on the idea that the adsorption depends on the energy of the adsorption sites. The n constant value of 1 indicates to the heterogeneous nature of the surface of the adsorbent and unfavourable adsorption. The situation $n>1$ is most common and may be due to a distribution of surface sites or any factor that causes a decrease in adsorbent-adsorbate

interaction with increasing surface density [45].

Results suggest that both Langmuir isotherm model and the Freundlich can generate satisfactory fit to the experimental MIP data. The results revealed that Freundlich model was more applicable to estimate the affinity distributions than the Langmuir model according to the correlation coefficients (R^2). The Freundlich isotherm model is the earliest known relationship describing the non-ideal and reversible adsorption, which can be applied to multilayer adsorption, on the basis of an assumption concerning the energetic surface heterogeneity. Additionally, a Scatchard analysis of binding of 1-OHP to the MIP was carried out by Eq. (5).

$$Q/C = \frac{(Q_{\text{max}} - Q)}{K_d} = (1/K_d) \times Q + Q_{\text{max}}/K_d \quad (5)$$

where K_d and Q_{max} are the equilibrium dissociation constant and the apparent maximum number of binding sites, respectively, and C is the adsorbed concentration of 1-OHP.

The Scatchard graph (Fig. 3) obtained was not linear and suggested that the binding sites in the MIP were not uniform and two classes of binding sites with differing K_d values existed in the MIP.

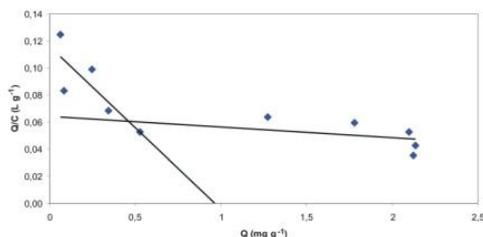


Fig. 3. Scatchard analysis of binding of 1-OHP to the MIP.

3.3. Optimisation of FI system variables

In this optimisation procedure, our primary objective was studied MIP and NIP extraction in batch and the common steps of conditioning, sample loading, washing and elution have to be carried out. In these preliminary studies, loading, washing and elution solvents and volumes of them were optimised. According to the literature, the solvent used as porogen during polymerisation was chosen as loading solvent. In this case, acetonitrile was chosen as loading solvent in order to allow rebinding of the analyte to specific sites. Ensuring complete remove of the interfering compounds non-specifically retained, different washing solvents were investigated: water, acetonitrile, and mixture methanol-acetonitrile and acetonitrile-water. The analysis of fractions collected from the washing step showed that the best results were obtained using ACN:water (95:5, v:v). In the last, the elution solvent has to be optimised according to its ability to disrupt the analyte polymer interaction. Methanol, methanol:ACN (80:20, v:v), ACN:water (80:20, v:v) and methanol:DCM (85:15, v:v) were studied as elution solvents. In the optimum conditions, the best recovery (78%) was obtained using the mixture of MeOH:DCM (85:15, v:v). The concentration of 1-OHP in this batch experiment was analysed by HPLC-FD [24]. Subsequently, other variables influencing the FI system were optimised. Optimum solvents and solutions selected in batch experiments were studied using the flow injection system shows in Figure 1. We used acetonitrile as the carrier solvent and sample loading, a mixture of ACN:water (95:5, v:v) as washing solvent and a mixture of polar protic solvent (MeOH) and polar aprotic solvent (DCM) in 85:15 proportions as elution solution. Then, different concentrations of 1-OHP (10 to 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) in acetonitrile were prepared to assess loading concentration. Afterward, different sample volume and the flow rate were tested. Values

of 250 μL and 1 mL min^{-1} were chosen, respectively, as a compromise between sensitivity and good sample throughput. The response signal was obtained after only a short run time (around 1.5 min).

Fig. 4 shows the response profile for 1-OHP using MIP and NIP micro-column in the FI system. The high fluorescence intensity in the elution peak for MIP reveal a significant uptake of 1-OHP compared to NIP. In the NIP system, 1-OHP was not retained in the micro-column, flowing with the carrier and producing a small increment in the fluorescence intensity that immediately returned to baseline. In the MIP system, after injection sample, 1-OHP was totally retained by MIP and no increase in fluorescence intensity was observed. Subsequently, when the eluent passed through the system a rapid increase in the fluorescence signal was produced, which declined after reaching maximum. Finally, the carrier solution was passed through again to recover the baseline and regenerate the system for the next analysis.

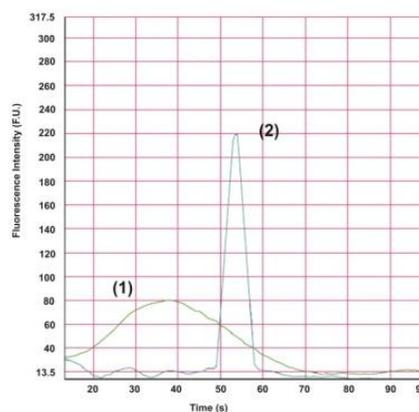


Fig. 4. Response profiles in the FI system for standard solution of 1-OHP ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) using NIP system (1) or MIP system (2).

The optimised procedure was applied to urine samples free of 1-OHP spiked with the working solution at different level of concentrations (10 to 400 $\mu\text{g L}^{-1}$), according to real values analysed in occupationally exposed subjects (coke-oven workers) [16]. Fig. 5 shows response signal of sample without micro-column (1) and response signal of MIP system. Washing step signal (2) and elution step (3) were observed.

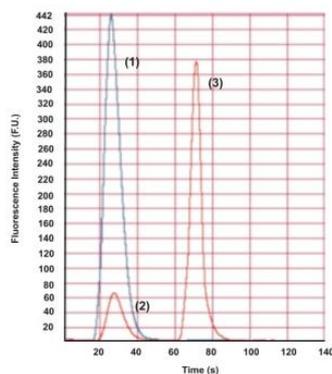


Fig. 5. Response profiles in the FI system for 1-OHP ($400 \mu\text{g L}^{-1}$). Signal for urine sample without micro-column (1) and with MIP micro-column: (2) washing step and (3) elution step.

3.4. Validation of the procedure

The analytical characteristics of the proposed procedure were evaluated. The calibration curve was constructed by preparing blank urine samples spiked with known amounts of

working standard solutions of 1-OHP in a range of $10 - 400 \mu\text{g L}^{-1}$. The linearity of three calibration curves was studied with a model linear regression. The mean calibration equation was $Y=149,32X+0,72$. The results showed a good linearity with a mean squared correlation coefficient (R^2) of 0.996. The LOD and LOQ values were calculated at signal-to-noise ratios of 3 and 10 respectively, following IUPAC recommendations. The LOD obtained was $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$ and the LOQ was $10.5 \mu\text{g L}^{-1}$, and the precisions (RSD) were $< 4.6 \%$. The optimised method was successfully applied to the determination of 1-OHP with recoveries in the range of $74 - 85\%$ for spiked urine samples providing greater specificity of MIP compared with traditional sorbents. The precision of the method was evaluated with RSD in terms of reproducibility (inter-day precision) and repeatability (intra-day precision). Percentage of recovery and precision are summarised in Table 2.

Table 2. Precision and recovery percentages of 1-OHP in the proposed method.

	Concentration Level ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precision (%)	Recovery (%) Mean \pm SD
Intra-day precision (n=3)	10	3.77	84.88 \pm 5.03
	100	1.01	74.01 \pm 0.75
	400	4.43	80.98 \pm 3.59
Inter-day precision (n=3)	10	0.48	85.17 \pm 3.42
	100	4.53	82.74 \pm 3.75
	400	4.47	81.46 \pm 3.86

To our knowledge, flow injection solid-phase extraction pre-concentration or on-line systems applied to determination of PAHs are limited. Coordination polymers were explored as sorbent for flow injection SPE on line coupled with HPLC-UV of PAHs in water [33]. In other studies, three kinds of materials (C30 particles, monolithic silica C18 stationary phase and quartz wool coated with C30) were used as sorbing media of PAHs for the on-line enrichment of aqueous PAHs in micro-column LC [35]. On the other hand, only three works had been reported the application of MIP for hydroxylated metabolites [24, 40, 46] and the present work is the first flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the pre-concentration and determination of 1-OHP in urine samples. The developed procedure is simple, sensitive, selective, fast and cost-effective with short response time (1.5 min) and allows 1-OHP to be detected

over a wide range ($10 - 400 \mu\text{g L}^{-1}$). On the other hand, luminescence spectrometer is an equipment usually find in routine laboratories and does not require highly trained personnel. The method provides good recoveries and offers the possibility of other coupling strategies. This system could be easily used as screening method to evaluated exposure in environmental and occupational health studies.

4. Conclusions

In this work, a molecularly imprinted polymer for 1-OHP was synthesised and a MAE protocol was optimised with the aim of reducing this time and increasing extraction efficiency. A novel flow injection solid-phase extraction pre-concentration system using this molecularly imprinted polymer packed micro-column was developed for the determination

of 1-hydroxypyrene in human urine with fluorescence detection. The proposed procedure shows good selectivity, sensitivity and reproducibility. In addition, this procedure is cheaper than other techniques and offers the possibility of other coupling strategies. The method developed has a good recoveries and short response time (1.5 min) and allows 1-OHP to be detected over a wide range (10 – 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) with no changes to the analytical procedure.

Acknowledgements

Authors thank the Comunidad Autónoma of Madrid and European funding from FEDER (Fonds Européen de Développement Économique et Régional) programme (Project S2013/ABI-3028, AVANSECAL).

References

- [1] ATSR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Atlanta, 1995.
- [2] European Comision-Scientific Committee on Food, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Occurrence in Foods. Dietary Exposure and Health Effects, European Commission, Brussels, 2002.
- [3] IARC, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, World Health Organization, Lyon, 2010.
- [4] J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, Human biomonitoring: State of the art, *Int. J. Hyg. Environ.-Health*, 210 (2007) 201-228.
- [5] F. Onyemauwa, S.M. Rappaport, J.R. Sobus, D. Gajdosova, R.a. Wu, S. Waidyanatha, Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify mono hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 1117-1125.
- [6] Y. Wang, W.B. Zhang, Y.L. Dong, R.F. Fan, G.Y. Sheng, J.M. Fu, Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383 (2005) 804-809.
- [7] T. Chetianukornkul, A. Toriba, T. Kameda, N. Tang, K. Hayakawa, Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 712-718.
- [8] Health Canada, Second report on human biomonitoring of environmental chemicals in Canada, Health Canada, Ottawa, 2013.
- [9] M. Bartolome, J.J Ramos, F. Cutanda, O. Huetos, M. Esteban, M. Ruiz-Moraga, E. Calvo, B. Pérez-Gómez, O. González, A. Castaño. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENT.ES project, *Chemosphere*, 135 (2015) 436-446.
- [10] R. Jacob, A. Seidel, Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine, *J. Chromatogr. B*, 778 (2002) 31-47.
- [11] L.C. Romanoff, Z. Li, K.J. Young, N.C. Blakely, D.G. Patterson, C.D. Sandau, Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 835 (2006) 47-54.
- [12] Q. Miao, M. Bouchard, D. Chen, I. Burstyn, J.J. Spinelli, K.J. Aronson, Assessing traffic and polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in Montreal, Canada, *Sci. Total Environ*, 470-471 (2014) 945-953.
- [13] L.C. Andre Amorim, J.-M. Dimandja, Z.d.L. Cardeal, Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionisation detector, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2900-2904.
- [14] B. Ramsauer, K. Sterz, H.-W. Hagedorn, J. Engl, G. Scherer, M. McEwan, G. Errington, J. Shepperd, F. Cheung, A liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in urine of non-smokers and smokers, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 877-889.
- [15] S. Sen, S.L. Gelhaus, I.A. Blair, Analysis of Hydroxybenzo a pyrenes in Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy: Applications as a Response Biomarker for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure, *Chem. Res. Toxicol.*, 21 (2008) 2440-2441.
- [16] L. Campo, F. Rossella, S. Fustinoni, Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 531-540.
- [17] D. Barbeau, A. Maitre, M. Marques, Highly sensitive routine method for urinary 3-

- hydroxybenzo a pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction, *Analyst*, 136 (2011) 1183-1191.
- [18] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A*, 1221 (2012) 84-98.
- [19] Z. Huang, H.K. Lee, Materials-based approaches to minimizing solvent usage in analytical sample preparation, *TrAC Trends*, 39 (2012) 228-244.
- [20] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo, Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 97-115.
- [21] S. Clavijo, J. Avivar, R. Suárez, V. Cerdà, Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques, *TrAC Trends*, 67 (2015) 26-33.
- [22] W.L. Huang, C.J. Smith, C.J. Walcott, J. Grainger, D.G. Patterson, Comparison of sample preparation and analysis using solid-phase extraction and solid-phase microextraction to determine monohydroxy PAH in urine by GC/HRMS, *Polycycl. Aromat. Comp.*, 22 (2002) 339-351.
- [23] W. Huang, J. Ding, Y.-Q. Feng, Magnetic Solid Phase Extraction Followed by High Performance Liquid Chromatography for Determination of Urinary 1-Hydroxypyrene, *Chinese J. Anal. Chem.*, 40 (2012) 830-834.
- [24] M. Serrano, M. Bartolome, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, J.M. Bravo, P. Fernández, *Talanta*, 143 (2015) 71-76.
- [25] C.K. Lee, S.H. Cho, J.W. Kang, S.J. Lee, Y.S. Ju, J.H. Sung, P.T. Strickland, D.H. Kang, Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicol. Lett.*, 108 (1999) 209-215.
- [26] M. Mattarozzi, M. Musci, M. Careri, A. Mangia, S. Fustinoni, L. Campo, F. Bianchi, A novel headspace solid-phase microextraction method using in situ derivatisation and a diethoxydiphenylsilane fibre for the gas chromatography-mass spectrometry determination of urinary hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 5634-5639.
- [27] C.J. Smith, C.J. Walcott, W.L. Huang, V. Maggio, J. Grainger, D.G. Patterson, Determination of selected monohydroxy metabolites of 2-, 3- and 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by solid-phase microextraction and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 778 (2002) 157-164.
- [28] K. Desmet, B. Tienpont, P. Sandra, Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in-situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption - Capillary gas chromatography - Mass spectrometry, *Chromatographia*, 57 (2003) 681-685.
- [29] G. Zhao, Y.S. Chen, S. Wang, J.J. Yu, X.Y. Wang, F.W. Xie, H.M. Liu, J.P. Xie, Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Talanta*, 116 (2013) 822-826.
- [30] M. Lamotte, R. Belfutmi, P.F. de Violet, P. Garrigues, M. Lafontaine, C. Dumas, Detection of 1-hydroxypyrene in urine by direct fluorometric analysis on a solid sorbing phase. Validation and application of the method to biological monitoring of PAH-exposed persons, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 816-821.
- [31] K.-S. Boos, J. Lintelmann, A. Kettrup, Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1-hydroxypyrene in urine of subjects exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr. A*, 600 (1992) 189-194.
- [32] K.N. Andrew, M.G. Sanders, S. Forbes, P.J. Worsfold, Flow methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using low power photomultiplier tube and charge coupled device chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, 346 (1997) 113-120.
- [33] Y.-Y. Zhou, X.-P. Yan, K.-N. Kim, S.-W. Wang, M.-G. Liu, Exploration of coordination polymer as sorbent for flow injection solid-phase extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental materials, *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 172-178.
- [34] Y. Hashi, T.-R. Wang, Y.-Q. Li, J.-M. Lin, On-line enrichment and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulates using high performance liquid chromatography with fluorescence as detector, *J. Environ. Sci.*, 19 (2007) 1261-1265.
- [35] L.W. Lim, Y. Okouchi, T. Takeuchi, On-line preconcentration of trace carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microcolumn liquid chromatography via large volume injection, *Talanta*, 72 (2007) 1600-1608.
- [36] C.F. Li, J.W.C. Wong, C.W. Huie, M.M.F. Choi, On-line flow injection-cloud point

- preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1214 (2008) 11-16.
- [37] H. Wu, X. Wang, B. Liu, J. Lu, B. Du, L. Zhang, J. Ji, Q. Yue, B. Han, Flow injection solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes packed micro-column for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2911-2917.
- [38] A. Toriba, H. Nakamura, T. Chetiyakornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, T. Yokoi, K. Hayakawa, Method for determining monohydroxybenzo a pyrene isomers using column-switching high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 312 (2003) 14-22.
- [39] X. Cahours, M. Blanchet, M. Rey, Fast and simple method for the determination of urinary 1-hydroxypyrene, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 3403-3410.
- [40] J.J. Olmos-Espejel, M.P. Garcia de Llasera, M. Velasco-Cruz, Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo a pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1262 (2012) 138-147.
- [41] A. Martín-Esteban, Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation, *TrAC Trends*, 45 (2013) 169-181.
- [42] Y. Hu, J. Pan, K. Zhang, H. Lian, G. Li, Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation, *TrAC*, 43 (2013) 37-52.
- [43] L. Ye, K. Mosbach, Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics, *React. Funct. Polym.*, 48 (2001) 149-157.
- [44] C. Nantasenamat, C. Isarankura-Na-Ayudhya, T. Naenna, V. Prachayasittikul, Quantitative structure-imprinting factor relationship of molecularly imprinted polymers, *Biosen. Bioelectron.*, 22 (2007) 3309-3317.
- [45] C. Baggiani, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Tozzi, L. Anfossi, Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template: Indirect evidence of the formation of template clusters in the binding site, *Anal. Chim. Acta*, 504 (2004) 43-52.
- [46] O. Baltrons, M. Lopez-Mesas, C. Palet, F. Le Derf, F. Portet-Koltalo, Molecularly imprinted polymer-liquid imprinted chromatography/fluorescence for the selective clean-up of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in soils, *Anal. Methods*, 5 (2013) 6297-6305.